

MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

ORGAN NARODOWEGO INSTYTUTU ZDROWIA PUBLICZNEGO
– PAŃSTWOWEGO ZAKŁADU HIGIENY
I POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

3-4

ROK LXIX KWARTALNIK 2017
NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO -
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNĄ I MIKROBIOLOGIA
Organ Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny i Polskiego Towarzystwa
Mikrobiologów

REDAKCJA

Redaktor: WALDEMAR RASTAWICKI
Zastępca Redaktora: RAFAŁ GIERCZYŃSKI
Sekretarz: KATARZYNA ZACHARCZUK
Redaktor językowy (język polski): STANISŁAW KAŁUŻEWSKI
Redaktor językowy (język angielski): MARIA DOMINGUEZ
Redaktor statystyczny: DANIEL RABCZENKO

KOMITET REDAKCYJNY

D. Dzierżanowska - Warszawa, S. Giedrys-Kalemba - Szczecin, E. Gołąb - Warszawa,
E. Gospodarek - Bydgoszcz, P.B. Heczko - Kraków, A. Jaworski - Łódź,
B. Litwińska - Warszawa, K. Piekarska - Warszawa, B. Różalska - Łódź,
A. Stankiewicz - Warszawa, E.M. Szewczyk - Łódź, A. Szkaradkiewicz - Poznań,
J. Szych - Warszawa, E.A. Trafny - Warszawa, S. Tyski - Warszawa,
M.L. Zaremba - Białystok, A.A. Zasada - Warszawa, Z. Zwolska - Warszawa

Adres Redakcji: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
E-mail: medmikrobiol@pzh.gov.pl
Tel: 22 54 21 325; 22 54 21 240
Fax: 22 54 21 307
www.medmikro.org.pl

Indeks 365226

Punktacja za publikację wg MNiSW – 7 pkt.
Index Copernicus – 89,77 pkt.
Kwartalnik „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia” jest indeksowany
w bazie danych pn. Polska Bibliografia Lekarska (PBL).

NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO -
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

Skład i druk: Agencja Reklamowa TOP, ul. Toruńska 148, 87-800 Włocławek,
tel.: 54 423 20 40, fax: 54 423 20 80, www.agencjatop.pl

SPIS TREŚCI

PRACE ORYGINALNE

E. Kwapisz, K. Garbacz, M. Wierzbowska, M. Krause Występowanie metycylinoopornych <i>Staphylococcus aureus</i> u dorosłych pacjentów z objawami infekcji jamy ustnej	209
M. Jarosiewicz, K. Garbacz, W. Kamysz. Przeciwbakteryjna aktywność protegryny-1 w stosunku do szczepów <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> i <i>Staphylococcus aureus</i> pochodzących od zwierząt	215
K. Hass, H. Połowniak-Pracka, M. Pawelec, A. Woźniak, J. Skrzeczyńska, E. Waker, A. Magdziak. Ocena przydatności oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów uzyskanych bezpośrednio z posiewu krwi na płynne podłoża namnażające	223
W. Rastawicki, K. Gielarowiec, A. Chróst. Ocena częstości występowania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek <i>Escherichia coli</i> (VTEC) u osób z wybranych grup populacji polskiej	231
E. Krzyżewska, M. Speruda, B. Dudek, A. Kędziora, G. Bugla-Płoskońska. Zmiany w kompozycji białek błony zewnętrznej szczepów <i>Escherichia coli</i> wywołane działaniem nanokompozytów srebra	239
P. Dziewirz, M. Lemańska. Grzybica paznokci i skóry – analiza i omówienie wyników badań przeprowadzonych w Pracowni Mikrobiologii Laboratorium Przygoda grupa ALAB w Płocku w latach 2012 – 2016	251

PRACE POGLĄDOWE

K. Brodzik, P. Górską, K. Woźnica, M. Główna, K. Wdowiak, A.A. Zasada. Szczepienia przeciw pneumokokom	259
K. Morka, G. Bugla-Płoskońska. Rola czynników wirulencji <i>Yersinia enterocolitica</i> w nadawaniu oporności na działanie układu dopełniacza	269
M. Speruda, A. Kędziora, G. Bugla-Płoskońska. Antybakteryjne działanie nanocząstek srebra syntetyzowanych metodą zielonej chemii	281
W. Rastawicki. Serologiczna diagnostyka bakteryjnych zakażeń człowieka – błędy popełniane w wyborze i wykonaniu badań laboratoryjnych oraz w interpretacji ich wyników	289

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

E. Kwapisz, K. Garbacz, M. Wierzbowska, M. Krause. Prevalence of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> among adult patients with symptoms of oral infection	209
M. Jarosiewicz, K. Garbacz, W. Kamysz. Antibacterial activity of protegrin-1 against <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from animals	215
K. Hass, H. Połowniak-Pracka, M. Pawelec, A. Woźniak, J. Skrzeczyńska, E. Waker, A. Magdziak. Evaluation of the usefulness of the microbial susceptibility test done directly from blood culture on grooving media	223
W. Rastawicki, K. Gielarowiec, A. Chróst. Seroprevalence of antibodies against verocytotoxin-producing <i>Escherichia coli</i> (VTEC) in individuals from selected groups of the Polish population	231
E. Krzyżewska, M. Speruda, B. Dudek, A. Kędziora, G. Bugła-Płoskońska. Changes in the composition of outer membrane proteins of <i>Escherichia coli</i> strains caused by silver nanocomposites.....	239
P. Dziewirz, M. Lemańska. Toe and skin fungus - analysis and discussion of the results of research conducted in the Laboratory of Microbiology Laboratory Przygoda ALAB Group in Płock in the years 2012 – 2016	251

REVIEWS

K. Brodzik, P. Górską, K. Woźnica, M. Główska, K. Wdowiak, A.A. Zasada. Vaccination against pneumococcal disease	259
K. Morka, G. Bugła-Płoskońska. The role of <i>Yersinia enterocolitica</i> virulence factors in the complement resistance	269
M. Speruda, A. Kędziora, G. Bugła-Płoskońska. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by green chemistry method	281
W. Rastawicki. Serological diagnosis of bacterial infections - mistakes in the selection and execution of laboratory tests and in interpretation of the results	289

Występowanie metycylinoopornych *Staphylococcus aureus*
u dorosłych pacjentów z objawami infekcji jamy ustnej

Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
among adult patients with symptoms of oral infection

Ewa Kwapisz, Katarzyna Garbacz, Maria Wierzbowska, Mariola Krause

Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Najnowsze badania pokazują, że obecność metycylinoopornych *S. aureus* nie ogranicza się jedynie do nosa czy gardła. Skąpa wiedza na temat roli jaką odgrywa *S. aureus* w jamie ustnej powoduje brak stosownej diagnostyki mikrobiologicznej i odpowiednich schematów leczenia w stomatologii. Niniejsza praca miała na celu określenie częstości występowania oraz lekowrażliwości metycylinoopornych *S. aureus* (MRSA) w jamie ustnej dorosłych pacjentów z objawami infekcji.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, metycylinooporność, zakażenie jamy ustnej

ABSTRACT

Introduction: Despite the numerous studies on staphylococcal infections, relatively little attention has been paid to the oral cavity as a reservoir of *Staphylococcus aureus*. The aim of the study was to analyze the prevalence of *S. aureus* and their antibiotic resistance among adult patients with symptoms of oral infection.

Materials and Methods: A total of 1560 oral specimens (tongue swabs, oral mucosal swabs, angle of mouth and denture swabs) from 535 adult patients with oral infection were studied. The materials were subcultured onto Columbia blood agar and Chapman agar incubated at 37°C for 48 hours. The resistance of *S. aureus* isolates to antimicrobial agents was determined by disk diffusion and interpreted according to the EUCAST. Suspected methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates were further examined for the presence of modified PBP2a protein.

Results: For the period 2016-17, from 1560 oral specimens 188 (12,1%) *S. aureus* were isolated, of which 28 (14,9%) isolates were resistant to methicillin. MRSA was isolated more frequent from patients with denture. The most common oral specimen type from which *S. aureus* was isolated was a tongue swab. The MRSA isolates showed resistance to gentamicin (71,4%), tetracycline (42,8%), erythromycin (35,7%), clindamycin (28,6%), ciprofloxacin (7%), and cotrimoxazol (7%).

Conclusions: This study demonstrates that oral cavity in adult patients with symptoms of infection may be reservoir of methicillin resistant *S. aureus*, and justifies microbiological diagnostic and monitoring of staphylococcal colonization in dental treatment.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistance, oral infection

WSTĘP

Pomimo dużej liczby badań dotyczących infekcji wywołanych przez *Staphylococcus aureus* stosunkowo mało uwagi poświęca się jamie ustnej jako niszy kolonizowanej przez tę bakterię. Gronkowce złociste mogą być izolowane ze zębów nazębnych, dziąseł w stanie zapalnym, kątów ust, z ropni okołowierchołkowych, a także z zakażeń wokół implantów (9,16). Pomimo tego traktuje się je jako składnik flory przejściowej. Zdecydowany niedostatek wiedzy na temat roli jaką odgrywa *S. aureus* u ludzi zdrowych i ze schorzeniami jamy ustnej powoduje, że jego udział bywa niekiedy pomijany. Najnowsze badania pokazują, że monitorowanie obecności *S. aureus* w jamie ustnej jest istotne nie tylko ze względu na trafne określenie etiologii schorzenia, ale również ze względu na ryzyko rozprzestrzeniania się szczepów o wysokiej oporności na antybiotyki, w tym na metycylinę (MRSA). Okazuje się, że występowanie MRSA w jamie ustnej może być częstsze niż w nosogardzieli czy na skórze, a jego eradykacja bardziej utrudniona (13). W związku z tym jama ustna bywa nie tylko źródłem wysiewu MRSA do innych miejsc w organizmie, ale może być również rezerwuarem zakażeń krzyżowych pomiędzy personelem i pacjentami. Wiedza na temat obecności MRSA w jamie ustnej daje możliwość skutecznego zapobiegania szerzeniu się tego zakażenia zarówno w środowisku szpitalnym jaki i poza nim.

Celem pracy było określenie częstości występowania oraz ocena lekowrażliwości metycylinoopornych *S. aureus* (MRSA) w materiałach pochodzących od dorosłych pacjentów z objawami infekcji jamy ustnej.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono w latach 2016-2017 na 1560 materiałach pochodzących od 535 dorosłych osób z objawami infekcji jamy ustnej. Pacjenci uskarżali się na dolegliwości związane z suchością, zaczerwienieniem, pieczeniem i obrzękiem w jamie ustnej oraz niekiedy zaburzeniami smaku. Materiał stanowiły wymazy z zapalnie zmienionej błony śluzowej jamy ustnej, grzbietowej powierzchni języka, kątów ust, dodatkowo wymazy z protezy u osób je użytkujących. Pobrane materiały posiewano na podłoża Columbia agar i Chapman Agar (bioMerieux) i inkubowano w temp. 37°C przez 48h. Drobnoustroje identyfikowano za pomocą testów PASTOREX™STAPH-PLUS (BIO-RAD) oraz biochemicznych API ID32 STAPH (bioMerieux). Do oceny antybiotykooporności zastosowano metodę krążkowo-dyfuzyjną na podłożu Mueller-Hinton agar. Interpretację wyników prowadzono zgodnie z rekomendacjami EUCAST (4). Użyto następujących antybiotyków: cefoksytyna (30µg), erytromycyna (15µg), ciprofloksacyna (5µg), klindamycyna (2µg), chloramfenikol (30µg), tetracyklina (30µg), gentamycyna (10µg), kotrimoksazol (sulfametoksazol+trimetoprim 1.25/23,75µg) i wankomycyna (E-test) (Becton, Dickinson and Company). Szczepy odporne na cefoksytynę posiewano na podłoże chromogenne z oksacyliną (Oxacillin Resistance

Screening Agar Base Oxoid). Dodatkowo oporność na oksacylinę (MRSA) potwierdzono testem lateksowym, wykrywając zmodyfikowane białka PBP2a (PBP2'TEST KIT Oxoid).

WYNIKI

Spośród 1560 badanych próbek materiału wyizolowano 188 *S. aureus*, co stanowiło 12,1%. Próbkę pochodziły od 535 dorosłych osób, których średnia wieku wynosiła 57 lat; u 84 (15,7%) z nich znaleziono *S. aureus*. Spośród 188 izolatów 28 (14,9%) stanowiły metycylinooporne gronkowce złociste (MRSA). *S. aureus* częściej izolowano od pacjentów z protezą, w szczególności szczepy metycylinooporne, które ponad 2-krotnie częściej odnotowano w tej grupie (22 MRSA na 326 pacjentów) niż u pacjentów bez protezy (6 MRSA na 209 pacjentów) (Tabela I).

Tabela I. Występowanie *S. aureus* w jamie ustnej dorosłych pacjentów z objawami infekcji

Pacjenci	Liczba pacjentów	Ogółem <i>S. aureus</i>	MRSA	MSSA
Z protezą	326	119	22	97
Bez protezy	209	69	6	63
Ogółem	535	188	28	160

MRSA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

Analizując częstość izolacji *S. aureus* w odniesieniu do rodzaju badanego materiału można zauważyć, że u 31% był on obecny w każdym materiale pobranym od pacjenta, u 23% wyłącznie w wymazie z języka, u 15 % wyłącznie w wymazie z błon śluzowych, u 5,5% wyłącznie na protezie, a jedynie u 3,3% wyłącznie w wymazie z kątów ust. Ogółem *S. aureus*, w tym MRSA najczęściej był izolowany z języka.

Większość wyizolowanych gronkowców okazała się oporna na gentamycynę, a wrazliwa na inne badane antybiotyki. Oporność MRSA najczęściej dotyczyła: gentamycyny (71%), tetracykliny (43%), erytromycyny (36%) i klindamycyny (29%). Izolaty MRSA aż w 50% były wielolekooporne (oporność na trzy i więcej grup antybiotyków), w odróżnieniu od szczepów MSSA (13%) (Tabela II).

Tabela II. Lekooporność izolatów *S. aureus* pochodzących z jamy ustnej dorosłych pacjentów z objawami infekcji

Antybiotyk	MRSA % (n=28)	MSSA % (n=160)	Ogółem <i>S. aureus</i> % (n=188)
gentamycyna	71,4 (20)	68,8 (110)	69,1 (130)
tetracyklina	42,8 (12)	38,8 (62)	39,4 (74)
erytromycyna	35,7(10)	14,4 (23)	17,5 (33)
klindamycyna	28,6 (8)	5 (8)	8,5 (16)
chloramfenikol	14,3 (4)	5 (8)	6,4 (12)
ciprofloksacyna	7,1 (2)	0	1,1 (2)
kotrimoksazol	7,1 (2)	2,5 (4)	3,2 (6)
wankomycyna	0	0	0
MDR	50 (14)	13 (21)	18,6 (35)

MRSA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MDR multidrug resistant

DYSKUSJA

Częstość występowania *S. aureus* w jamie ustnej różni się w zależności od badanej grupy. Wydaje się, że jest ona wyższa u małych dzieci (1-5 lat) niż u dorosłych i może wynosić od 33% do 64% (5, 10). Określony przez nas odsetek u ludzi dorosłych jest zbliżony do tego notowanego ostatnio przez innych autorów. Zarówno McCormack i wsp. (9) badający pacjentów z infekcją jak i Koukos i wsp. (7) badający ludzi zdrowych i z chorobami przyzębia określił go na około 18%.

U ludzi starszych zauważa się tendencję do wzrostu częstości izolacji *S. aureus* (14). Trudno jednoznacznie ocenić czy ma to jedynie związek z wiekiem i uwarunkowanymi tym zmianami w organizmie czy jest skutkiem używania protez. W naszych badaniach, podobnie jak Lewis i wsp. zauważyliśmy częstsze występowanie *S. aureus* u ludzi używających protezy (8).

Częstsze występowanie *S. aureus* w jamie ustnej notuje się też u pacjentów z białaczką, z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz żywionych pozajelitowo. Grupą narażoną na gronkowcowe infekcje jamy ustnej są też osoby z ustną postacią choroby Crohna oraz z ograniczonym wydzielaniem śliny (ksero stomią) (2, 12).

Szczepy gronkowców złocistych opornych na metycylinę były dotąd najczęściej izolowane w środowisku szpitalnym, a wewnątrzszpitalna transmisja HA-MRSA (hospital acquired MRSA) między ludźmi była uważana za główną drogę rozprzestrzeniania się patogenu. Jednak w ostatnim czasie zaobserwowano wzrost częstości zakażeń MRSA nie związanych ze środowiskiem szpitalnym tzw. CA-MRSA (community-acquired MRSA), mających miejsce w domach opieki, ośrodkach zdrowia, przedszkolach czy szkołach (3, 11). Skutecznym sposobem zapobiegania szerzeniu się infekcji MRSA jest monitorowanie kolonizacji pacjentów poddawanych leczeniu, w tym również leczeniu stomatologicznemu. Opisano bowiem przypadki krzyżowych infekcji szczepami MRSA od lekarzy stomatologów do pacjentów i odwrotnie (14).

Uzyskana przez nas częstość występowania MRSA w jamie ustnej jest zbliżona, do tej podawanej w najnowszej literaturze, od zera do kilkunastu procent (8, 9, 14). Wydaje się, że zależy ona od struktury badanej populacji i przedziału czasowego badań. Koukos i wsp. (7) porównujący grupę ludzi zdrowych z grupą z chorobami przyzębia nie stwierdził żadnego przypadku izolacji MRSA. Natomiast trzyletnie badania Smith i wsp. (14) wykazały obecność MRSA w jamie ustnej u 6% pacjentów, głównie tych powyżej 70 roku życia i mieszkających w domach opieki i hospicjach. Jeszcze wyższe odsetki odnotował McCormack i wsp. (9) na podstawie dziesięcioletniej retrospektywnej analizy wyników posiewów różnych materiałów z jamy ustnej, a także Lewis i wsp. (8) badający kolonizację protez dentystycznych na 100-osobowej grupie pacjentów szpitalnych.

Wydaje się, że częstość izolacji MRSA zależy również od rodzaju materiału pobranego z jamy ustnej. Zarówno McCormack i wsp. jak i Smith i wsp. odnotowali, że izolaty MRSA najczęściej pochodziły z wymazów z języka (9, 14), co być może wynika z różnic w receptorach powierzchniowych w komórkach nabłonków różnych miejsc jamy ustnej. W naszych badaniach również stwierdziliśmy najczęstszą izolację MRSA z języka, ale nie zauważyliśmy różnicy w odniesieniu do MSSA.

Zarówno McCormack jak i Smith zauważyli, że takie objawy jak rumień, obrzęk, ból i pieczenie częściej dotyczyły infekcji wywołanej szczepami MRSA niż MSSA, co może

mieć związek z dużym potencjałem toksynotwórczym tych szczepów. *Miyake* i wsp. (10) stwierdził, że szczepy *S. aureus* z jamy ustnej wytwarzają różne egzotoksyny, w tym eksfoliatynę i TSST-1, które mogą zaostrzać przebieg zakażenia.

Wyzisolowane w niniejszej pracy MRSA były najczęściej odporne na gentamycynę (71%), natomiast najrzadziej odporne na ciprofloksacynę i kotrimoksazol. Wszystkie izolaty były wrażliwe na wankomycynę. Podobne wyniki przedstawił *Kim* i wsp. (6) badający gronkowce złociste wyizolowane z jamy ustnej osób z zapaleniem dziąseł.

Jak podaje *Waksmańska* i wsp. (15) oraz *Gade* i wsp. (1) oporność MRSA na aminoglikozydy jest częstym zjawiskiem w środowisku szpitalnym, z którego jednak nasze izolaty nie pochodziły. Można przypuszczać, iż były to najprawdopodobniej izolaty CA-MRSA, wymaga to jednak dalszych badań.

WNIOSKI

Niniejsza praca pokazuje, że jama ustna dorosłych ludzi z objawami infekcji może być nie tylko rezerwuarem gronkowca złocistego, ale również izolatów metacyklinoopornych, co uzasadnia potrzebę diagnostyki mikrobiologicznej i monitorowania kolonizacji *S. aureus* w stomatologii.

PIŚMIENNICTWO

1. *Gade ND, Qazi MS*. Recent trend of aminoglycoside resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in tertiary care hospital. J Microbiol Antimicrob 2014; 6, 6: 94-6.
2. *Gibson J, Wray D, Bagg J*. Oral staphylococcal mucositis. A new clinical entity in orofacial granulomatosis and Crohn's disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 89:171-6
3. *Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA* i inni. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. Science 2010; 327: 469-74.
4. http://www.korId.edu.pl/pdf/EUCAST_breakpoints_t%C5%82umaczenie_vercja_6_2016.pdf.
5. *Jackson MS, Bagg J, Kennedy H, Michie J*. Staphylococci in the oral flora of healthy children and those receiving treatment for malignant disease. Microb Ecol Health Dis 2000; 12: 60-4.
6. *Kim G-Y, Lee Ch H*. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. J Periodontal Implant 2015 ; 45, 6: 223-8.
7. *Koukos G, Sakellari D, Arsenakis M, Tsalikis L* i inni. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. Arch Oral Biol 2015; 60: 1410-5.
8. *Lewis N, Parmar N, Hussain Z* i inni. Colonisation of dentures by *Staphylococcus aureus* and MRSA in out-patient and in-patient populations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 1823-6.
9. *McCormack MG, Smith AJ, Akram AN* i inni. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? Am J Infect Control 2015; 43,1: 35-7.

10. Miyake Y, Iwai T, Sugai M, Miura KJ. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. Dent Res. 1991; 70: 1045-7.
11. Otter J, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect. Dis. 2010; 10: 227-39.
12. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. J Oral Pathol 1986; 15: 386-8.
13. Small H, Elliott TSJ, Casey AL i inni. The oral cavity - An overlooked site for MRSA screening and subsequent decolonisation therapy? J Infect 2007; 55: 378-83.
14. Smith AJ, Robertson D, Tang MK i inni. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J 2003; 195: 701-3.
15. Waksmańska W, Wiczkowski A, Bobiński R, Ślemp-Migiel A. Zakażenia gronkowcowe w Podhalańskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II w Nowym Targu w latach 2001-2004 – analiza antybiotykooporności. Med Dośw Mikrobiol 2017; 69: 5-13.
16. Zhuang L-F, Matheos N, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. Clin Oral Impl Res 2016; 27: 13-21.

Otrzymano: 25 VIII 2017 r.

Adres Autora: 80-204 Gdańsk, ul. Dębowa 25, Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

Przeciwbakteryjna aktywność protegryny-1
w stosunku do szczepów *Staphylococcus pseudintermedius*
i *Staphylococcus aureus* pochodzących od zwierząt

Antibacterial activity of protegrin-1 against *Staphylococcus*
pseudintermedius and *Staphylococcus aureus*
strains isolated from animals

Małgorzata Jarosiewicz¹, Katarzyna Garbacz¹, Wojciech Kamysz²

¹Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

²Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Szerząca się obecnie lekooporność gronkowców wywołujących infekcje zarówno u ludzi jak i zwierząt oraz możliwość ich transmisji stanowi światowy problem zdrowia publicznego. Trwają poszukiwania alternatywnych związków przeciwbakteryjnych, dobrym kandydatem wydają się być peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Niniejsza praca miała na celu określenie aktywności przeciwbakteryjnej protegryny-1 wobec szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* i *Staphylococcus aureus* pochodzących od zwierząt.

Słowa kluczowe: protegryna-1, PG-1, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, AMPs, *S. pseudintermedius*, *S. aureus*

ABSTRACT

Introduction: The bacterial resistance to the most clinically available antimicrobial agents has increased significantly. Frequent use of antibiotics in treatment and prevention of staphylococcal infections results in emerging antibiotic resistance of human and animal isolates. The resistance threat demands an increased effort to search for alternative chemotherapeutic compounds with new mechanisms of action. A good candidate for alternative to classical antibiotics seems to be naturally produced in all living organisms antimicrobial peptides (AMPs). The aim of the study was to analyze the *in vitro* activity of antimicrobial peptide protegrin-1 (PG-1) against *S. aureus* and *S. pseudintermedius* strains isolated from animal infections.

Materials and methods: The susceptibility of staphylococci strains to antibiotics was tested with the disk diffusion method in line with the EUCAST standards. Protegrin-1 was synthesized by Fmoc method, purified by SPE (Solid-Phase Extraction) or HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) and analyzed by mass spectrometry MALDI-TOF

(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry). The activity of protegrin-1 was examined using the broth dilution method in line with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines to designated MIC (Minimal inhibitory concentrations) and MBC (Minimal Bactericidal Concentration) values.

Results: Investigated *S. aureus* and *S. pseudintermedius* isolates were susceptible to protegrin-1. MIC₅₀ and MIC₉₀ for *S. pseudintermedius* equaled respectively 2 µg/mL and 4 µg/mL, while for *S. aureus* equaled 8 µg/mL and 32 µg/mL. All investigated strains *S. aureus* had MBC values the same as MICs. Whereas *S. pseudintermedius* strains had MBC values higher by one rank of MICs measure.

Conclusions: Investigated animal staphylococci strains were susceptible to natural antimicrobial peptide protegrin-1. The activity of PG-1 was irrespective of staphylococcal antibiotic resistance.

Key words: protegrin-1, PG-1, antimicrobial peptides, AMPs, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*

WSTĘP

Transmisja patogenów pomiędzy ludźmi i zwierzętami jest zjawiskiem powszechnym. Jedynie około 3% drobnoustrojów ma rezerwuary wyłącznie ludzkie. Gronkowce są bakteriami, które w toku ewolucji nabyły zdolność przełamывania barier międzygatunkowych i zakażenia zarówno ludzi jak i zwierząt (8). Dlatego jednoznaczne rozgraniczenie gronkowców na gatunki zakażające wyłącznie ludzi lub zwierzęta może być niekiedy utrudnione. *Staphylococcus aureus* jest gatunkiem patogennym głównie dla ludzi, ale może zakażać również psy, koty oraz wiele innych zwierząt. Uważa się, że kolonizacja psów przez *S. aureus* ma miejsce poprzez kontakt z człowiekiem. *Staphylococcus pseudintermedius* (niegdyś *S. intermedius*) kolonizuje głównie psy, ale również ich właścicieli (8, 14). Nosicielstwo zwierzęcych gronkowców jest szczególnie niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością. *S. pseudintermedius* był izolowany od ludzi z przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdza, opon mózgowo rdzeniowych, płuc oraz zatok przynosowych (14).

Istotny problem w medycynie i weterynarii stanowią gronkowcowe infekcje wywołane przez szczepy odporne na antybiotyki. Alarmująco rosnąca oporność zarówno wśród *S. aureus* jak i *S. pseudintermedius* niekiedy ogranicza możliwości terapeutyczne i niesie ryzyko transferu genów lekooporności pomiędzy gronkowcami bytującymi u ludzi i zwierząt. Dotyczy to w szczególności zakażeń szczepami metacyclinoopornymi, MRSP (Methicillin Resistant *S. pseudintermedius*) i MRSA (Methicillin Resistant *S. aureus*) (6, 13, 19). Skłania to do poszukiwania nowych preparatów przeciwbakteryjnych. Dobrym kandydatem wydają się być peptydy przeciwdrobnoustrojowe (*ang.* AMPs – antimicrobial peptides), wytwarzane powszechnie przez organizmy żywe jako element odporności nieswoistej. Ich zaletą jest szerokie spektrum działania, szybki efekt bakteriobójczy i niska toksyczność. Ze względu na odmienny mechanizm działania w porównaniu do klasycznych antybiotyków istnieje też niewielkie ryzyko wykształcenia oporności. Z tego względu trwają intensywne badania wielu zespołów na całym świecie nad możliwością stosowania ich w terapii zakażeń gronkowcowych (16).

Celem pracy było określenie wartości MIC i MBC protegryny-1 dla szczepów gronkowców *S. pseudintermedius* i *S. aureus* wyizolowanych z zakażeń u zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 47 szczepów *S. pseudintermedius* i 6 szczepów *S. aureus* wyizolowanych ze zmian skórnych od psów i kotów, leczonych w 12 gabinetach na terenie województwa pomorskiego. Każdy szczep gronkowca pochodził od innego zwierzęcia. Pobrany materiał posiewano na podłoże Columbia i Chapman agar (Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska). Genomowe DNA izolowano przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Bacteria (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Identyfikację gronkowców prowadzono w oparciu o detekcję genu gatunkowo specyficznej termostabilnej nukleazy (*nuc*) metodą PCR (4). Identyfikację gatunku *S. pseudintermedius* wykonano w oparciu o polimorfizm fragmentów restrykcyjnych zmiennego fragmentu genu acetylotransferazy fosforanowej (*pta*) metodą PCR-RFLP, z użyciem enzymu *Mbo*I (1, 4, 12). Wrażliwość gronkowców na antybiotyki określono metodą dyfuzyjno-krążkową zgodnie z EUCAST (10). W celu określenia metycylinooporności wykrywano gen *mecA* (5). Użyto następujących szczepów wzorcowych: *S. intermedius* PCM 2405, *S. aureus* ATCC 6538 oraz *S. aureus* ATCC 43300.

Protegryna-1 została zsyntezowana na stałym nośniku polimerowym z zastosowaniem metody Fmoc i oczyszczona za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) metodą gradientową w układzie faz woda-acetonitryl. Czystość peptydu potwierdzono analizą HPLC, a tożsamość spektrometrycznie metodą jonizacyjnej desorpcji laserowej na matrycy (MALDI-TOF) (23).

Aktywność protegryny-1 była badana metodą seryjnych rozcieńczeń w bulionie Mueller-Hinton II Broth (BLT Sp. z o.o., Łódź, Polska) na 96-dołkowych płytkach mikrotitracyjnych (SciencePlast Sp. z o.o., Gdańsk, Polska) zgodnie ze standardem Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (9). Dla szczepów *S. pseudintermedius* użyto stężeń peptydu od 0,5 µg/ml do 16 µg/ml, a dla szczepów *S. aureus* - od 1 µg/ml do 64 µg/ml. Bulion z peptydem zaszczepiano 15 µl inokulum bakterii o gęstości 5×10^5 CFU/ml. Płytki inkubowano przez 20h w temperaturze 37°C. Wartość MIC (Minimal Inhibitory Concentration) określono jako najniższe stężenie peptydu, w którym nie obserwowano wzrostu bakterii. Wartości MBC (Minimal Bactericidal Concentration) określano wysiewając ze studzienek z wartością MIC i wyższą 10 µl próby na podłoże Tryptic Soy Broth (TSB, BD Difco, USA) i inkubując w 37°C przez 48h.

WYNIKI

Protegryna-1 wykazywała aktywność bakteriostatyczną i bakteriobójczą wobec wszystkich badanych gronkowców. Wartości MIC dla *S. pseudintermedius* mieściły się w zakresie 2 µg/ml - 8 µg/ml, a dla *S. aureus* w zakresie 8 µg/ml - 32 µg/ml. MIC₅₀ *S. pseudintermedius* wynosił 2 µg/ml, MIC₉₀ 4 µg/ml, podczas gdy dla *S. aureus* były to odpowiednio wartości 8 µg/ml i 32 µg/ml. Efekt bakteriobójczy został osiągnięty w stężeniach: 4 µg/ml (MBC₅₀), 8 µg/ml (MBC₉₀) dla *S. pseudintermedius* oraz 8 µg/ml i 32 µg/ml dla *S. aureus*. Wszystkie szczepy *S. aureus* miały jednakowe wartości MIC i MBC, natomiast u *S. pseudintermedius* wartości MBC były o jeden rząd wyższe niż MIC (Tabela I).

Tabela I. Wartości MIC i MBC ($\mu\text{g/ml}$) protegryny-1 dla szczepów *S. aureus* i *S. pseudintermedius*.

Gatunek	MIC _{zakres}	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC _{zakres}	MBC ₅₀	MBC ₉₀
<i>S. pseudintermedius</i>	2 – 8	2	4	2 – 8	4	8
<i>S. aureus</i>	8 – 32	8	32	8 – 32	8	32

Badane szczepy obu gatunków gronkowców były oporne na klindamycynę (42%), erytromycynę (40%), penicylinę (31%), tetracyklinę (28%), chloramfenikol (28%), netylmycynę (25%), kotrimoksazol (23%), streptomycynę (21%), gentamycynę (10%), ciprofloksacynę (6%), doksycyklinę (6%), kwas fusydowy (6%). W badanej puli nie występowały szczepy oporne na metycylinę. Dominowały szczepy wielolekooporne (oporne na 3 i więcej antybiotyków z różnych grup), które stanowiły aż 45%. Nie zauważono istotnych różnic w wartościach MIC i MBC pomiędzy szczepami opornymi na mniejszą i większą liczbę antybiotyków (Tabela II).

Tabela II. Średnie wartości MIC i MBC ($\mu\text{g/ml}$) protegryny-1 w odniesieniu do antybiotykooporności obu badanych gatunków gronkowców.

Wrażliwość na antybiotyki	Ilość szczepów	MIC _{średni}	MBC _{średni}
wrażliwe	23%	4,5	4,7
oporne na 1 antybiotyk	21%	6,1	6,1
oporne na 2 antybiotyki	11%	3	3,7
oporne na 3 i więcej antybiotyków (wielolekooporne), w tym na:	45%	3,83	4,25
▪ 3 antybiotyki	15%	4,25	4,75
▪ 4 antybiotyki	8%	4	4
▪ 5 antybiotyków	9%	2,4	3,2
▪ 6 i więcej antybiotyków	13%	5,4	5,71

DYSKUSJA

Dotychczas odkryto około 2900 peptydów przeciwdrobnoustrojowych pochodzących z różnych źródeł (20). W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się protegrynom należącym do katelicydyn wytwarzanych przez neutrofile. Naturalne protegryny występują w pięciu wariantach od PG-1 do PG-5. Są zbudowane z 16-18 aminokwasów, a obecność dwóch mostków di-siarczkowych nadaje im budowę cykliczną. Najlepiej poznana jest protegryna-1 (RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH₂) zbudowana z 18 aminokwasów, która przyjmuje strukturę przeciwrównoległej β -kartki ustabilizowanej dwoma wiązaniami disiarczkowymi pomiędzy cysteinami (pozycje: 6 i 15 oraz 8 i 13). Jej amfipatyczny charakter wynika z hydrofobowości części centralnej i hydrofilowego charakteru części dystalnych. Protegryna-1 ma szerokie spektrum przeciwbakteryjne, dlatego trwają intensywne badania nad jej potencjalnym zastosowaniem zarówno w wersji naturalnej jak i zmodyfikowanej (7, 22).

Zbudowany z 17 aminokwasów (RGGLCYCRGRFCVCVGRHH₂) IB-367, nazywany isegananem, jest syntetycznym analogiem protegryny-1. Różnica pomiędzy protegryną-1 a isegananem dotyczy delecji argininy w pozycji 4 od C-końca oraz zamianie argininy w pozycji 10 na glicynę (18). Dobra aktywność przeciwbakteryjna IB-367 doprowadziła do prób klinicznych na pacjentach. Badano skuteczność IB-367 w formie wodnego roztworu u chorych sztucznie wentylowanych z zapaleniem płuc. Wyniki były częściowo zadowalające, ale wymagały przebadania innych aspektów potencjalnej terapii (15). Ise-ganan jest również aktualnie w III fazie badań klinicznych jako preparat zapobiegający zapaleniom błony śluzowej jamy ustnej. Badania są prowadzone z udziałem pacjentów onkologicznych z nowotworem szyi lub głowy, u których stosuje się radioterapię (21). Innym analogiem protegryny-1 jest BM-1, złożony z 15 aminokwasów (RGLCYCRGRFCVCVG-NH₂), mający dobrą aktywność przeciwdrobnoustrojową i szerokie spektrum działania. W badaniach *in vitro* wykazywał najwyższą skuteczność wobec bakterii gram-dodatnich (18).

Najczęstszą przyczyną stosowania antybiotykoterapii u psów są gronkowcowe, głębokie ropne zapalenia skóry i tkanki podskórnej (*pyodermatitis*). Zakażenia te mają tendencję do nawracania, co powoduje przedłużanie i powtarzanie leczenia antybiotykami, które trwa zwykle od 8 do 12 tygodni. Niepowodzenia w leczeniu ropnych zapaleń skóry u psów wynikają ze złożonej patogenezы choroby, w której dochodzi do powstania nadwrażliwości, indukowanej gronkowcowym peptydoglikanem. Powstałe w odpowiedzi IgE łączą się z receptorami komórek tucznych, co prowadzi do ich aktywacji i egzocytozy ziarnistości oraz uwalniania mediatorów reakcji anafilaktycznej. Przedłużona i powtarzająca się terapia antybiotykami przyczynia się do indukcji oporności u gronkowców i dotyczy najczęściej oporności na makrolidy, linkozamidy, kwas fusydowy, tetracykliny i aminoglikozydy. Dlatego trwają intensywne poszukiwania alternatywnych metod terapii zakażeń gronkowcowych u zwierząt (11).

W odniesieniu do szczepów *S. pseudintermedius* wywołujących pyodermie u psów określano aktywność różnych peptydów m.in. RRIKA, RR, WR-12, IK8 (izomer D), penetratinu, (KFF)₃K oraz melityny (17). Zgodnie z najlepszą wiedzą autorów protegryna-1 nie była dotychczas badana. Z prezentowanej pracy wynika, że protegryna wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec gronkowców izolowanych od zwierząt. Co należy podkreślić, jej aktywność jest większa wobec szczepów z gatunku *S. pseudintermedius* niż *S. aureus*. Zwierzęce szczepy *S. aureus*, które były przedmiotem prezentowanych badań, miały podobną wrażliwość do szczepów izolowanych od ludzi cierpiących na erytrodermię, a uzyskany efekt bakteriostatyczny (MIC) i bakteriobójczy (MBC) był zbliżony, odpowiednio zakresy 1 – 16 µg/ml oraz 2 – 32 µg/ml (2, 3).

Niewątpliwą zaletą działania protegryny-1 jest równie dobra aktywność wobec szczepów gronkowców wysoko i nisko opornych na antybiotyki. Badane szczepy posiadały zróżnicowaną antybiotykooporność, jednak zdecydowanie najwięcej z nich (45%) wykazywało oporność na 3 i więcej antybiotyków (szczepy MDR). Wielolekooporne szczepy były podatne na działanie peptydu w analogicznych stężeniach jak szczepy wrażliwe. Jednakowa aktywność protegryny-1, bez względu na antybiotykooporność gronkowców może wynikać z odmiennego mechanizmu działania AMPs. Podobną zależność w aktywności przeciwgronkowcowej AMPs zauważali inni autorzy (2, 17).

WNIOSKI

Wstępne wyniki aktywności protegryny-1 wobec zwierzęcych gronkowców są zachęcające i wynika z nich, że zarówno zwierzęce gronkowce z gatunku *S. pseudintermedius* jak i *S. aureus* są wrażliwe na protegrynę-1. Aktywność peptydu nie zależy od oporności gronkowców na antybiotyki.

PIŚMIENNICTWO

1. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M i inni. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol 2009; 47:469–71.
2. Barańska-Rybak W, Cirioni O, Dawgul M i inni. Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with neoplastic and inflammatory erythrodermia. Chemother Res Pract. 2011; 2011: 270932.
3. Barańska-Rybak W, Pikula M, Dawgul M i inni. Safety profile of antimicrobial peptides: camel, citropin, protegrin, temporin A and lipopeptide on HaCaT keratinocytes. Acta Pol Pharm. 2013; 70: 795–801.
4. Baron F, Cochet MF, Pellerin JL i inni. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. J Food Prot., 2004, 67: 2302–5.
5. Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol Cel Probes, 1996; 10:471-5.
6. Bierowiec K, Płoneczka-Janeczko K, Rypula K. Koty i psy jako rezerwuar *Staphylococcus aureus*. Postepy Hig Med Dosw 2014; 68: 992–7.
7. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7: 629–41.
8. Ciszewski M, Czekał T, Szewczyk EM. Nowe spojrzenie na bakteryjne patogeny odzwierzęce stanowiące zagrożenie dla człowieka. Medycyna Pracy 2014; 65: 819–29.
9. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. Document M100–S22. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne PA 2012.
10. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints . Data dostępu: 27.10.2017.
11. Ganiere JP, Medaille C, Mangion C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005; 52: 25-31.
12. Garbacz K, Żarnowska S, Piechowicz L, Haras K. Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. Virulence 2013; 4: 255–9.
13. Garbacz K, Żarnowska S, Piechowicz L, Haras K. Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance. Curr Microbiol 2013; 66: 169–73.
14. Kmieciak W, Szewczyk EM. Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus* – taksonomia, chorobotwórczość. Post. Mikrobiol. 2017; 56: 233–44.

15. Kollef M, Pittet D, Sanchez Garcia M i inni. A randomized double-blind trial of iseganan in prevention of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173:91–7.
16. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin in Pharmacol*. 2006; 6: 468–72.
17. Mohamed MF, Hammac GK, Guptill L, Seleem MN. Antibacterial activity of novel cationic peptides against clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from infected dogs. *PLoS One* 2014; 9: e116259.
18. Rodziejewicz–Motowidło S, Mickiewicz B, Greber K i inni. Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide. *FEBS J*. 2010; 277: 1010–22.
19. Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA i inni. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 1738–42.
20. The Antimicrobial Peptide Database. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> . data dostępu: 4.06.2017.
21. The Clinical Trials Database. <https://clinicaltrials.gov/> . data dostępu: 4.06.2017.
22. Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins - structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*. 2005; 6: 23–34.
23. Vojkovsky T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept Res* 1995; 8: 236–27.

Otrzymano: 6 VII 2017 r.

Adres Autora: 80-204 Gdańsk, ul. Dębowa 25, Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Ocena przydatności oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów uzyskanych bezpośrednio z posiewu krwi na płynne podłoża namnażające

Evaluation of the usefulness of the microbial susceptibility test done directly from blood culture on grooving media

Katarzyna Hass, Hanna Połowniak-Pracka, Maria Pawelec, Agnieszka Woźniak, Joanna Skrzeczyńska, Edyta Waker, Agnieszka Magdziak

Zakład Mikrobiologii Klinicznej, Centrum Onkologii
– Instytut im. Marii Skłodowskiej – Curie w Warszawie

Szybkie oznaczenie lekowrażliwości drobnoustrojów wyhodowanych z krwi ma zasadniczy wpływ na skuteczność antybiotykoterapii. Celem niniejszej pracy była ocena w jakim stopniu oznaczenie lekowrażliwości wykonane bezpośrednio z hodowli z krwi na podłożu namnażającym koreluje z wynikami oznaczenia lekowrażliwości uzyskanymi zgodnie ze standardową procedurą przyjętą przy opracowaniu próbki krwi.

Słowa kluczowe: sepsa, szybka diagnostyka, lekowrażliwość, posiew krwi

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is one of the most serious problem in hospital treatment, so earlier therapy optimizes patient outcomes. Standardized susceptibility testing result are available at 36-48h, therefore direct disc susceptibility testing from positive blood culture bottle gives a chance to get more effective treatment. The aim of this study was to compare the result of both methods.

Materials and Methods: For analysis selected samples were prepared from 01.01.2013 to 30.09.2014 from patients of Oncology Center in Warsaw. Were obtained 378 specimens from grown Gram negative rods and Staphylococcus sp. and compare the results of standardised and direct susceptibility methods.

Results: For all isolates essential agreement was more than 90,1%. Among Gram negative strains the most errors were from piperacilin/tazobactam (9,9%) and amikacin (9,4%), while among Staphylococcus sp from amikacin (8,6%).

Conclusions: Direct antibiotic susceptibility testing with samples taken directly from blood cultures can have a major impact on the care and outcome of hospitalized patients.

Key words: sepsis, blood culture, direct susceptibility testing

WSTĘP

Sepsa jest czwartym co do częstości występowania zakażeniem u hospitalizowanych pacjentów, stanowiąc 8-10% wszystkich przypadków zakażeń (7). Obserwowany jest stały wzrost liczby zachorowań, z których znaczna część (od 10% do 50% w zależności od stopnia ciężkości) kończy się zgonem pacjenta (11, 20, 25). Aż dwie trzecie przypadków posocznicy i wstrząsu septycznego występuje u pacjentów z ciężką chorobą podstawową (14,17).

U pacjentów z obniżoną odpornością, w tym u pacjentów onkologicznych, zarówno częstość występowania sepsy jak i śmiertelność jest wyższa od przeciętnej ze względu na wyniszczenie przez chorobę nowotworową, a także neutropenię, stosowanie chemio- i radioterapii oraz prowadzone zabiegi operacyjne (6). Bakteriemia, która często prowadzi do sepsy, powoduje wydłużenie pobytu pacjenta w szpitalu, często konieczność leczenia specjalistycznego na oddziale intensywnej terapii, a u chorych z nowotworem może odsunąć w czasie leczenie onkologiczne. Dodatkowo, długotrwały pobyt w szpitalu oraz wielokrotna antybiotykoterapia zwiększa ryzyko zakażenia osób chorych drobnoustrojami wieloopornymi. Przy rozpoznaniu posocznicy odpowiednie leczenie przeciwbakteryjne powinno być wdrożone jak najszybciej, gdyż każda godzina opóźnienia w podaniu antybiotyku powoduje istotny wzrost śmiertelności (6, 23). Ważne jest również to, aby podać antybiotyk optymalny, o wysokiej aktywności przeciw wyizolowanemu drobnoustrojowi (10, 13, 22).

Standardowa procedura opracowania próbki krwi obejmuje posiew próbki na specjalne podłoża namnażające i inkubację w odpowiednich warunkach, najczęściej w systemach zamkniętych np. BactAlert (bioMérieux), BACTEC (Becton Dickinson). Po uzyskaniu wzrostu drobnoustrojów prowadzona jest dalsza hodowla na podłożach stałych w celu izolacji określonego szczepu. Dalsza procedura obejmuje identyfikację i oznaczenie lekowrażliwości. Od momentu uzyskania wzrostu bakterii na podłożach płynnych do otrzymania wyniku lekowrażliwości upływa 2 do 3 dni. Wykonanie tzw. „przyspieszonego” antybiogramu bezpośrednio z płynnej hodowli umożliwia skrócenie tego czasu i szybsze przekazanie klinicyście informacji na temat wrażliwości drobnoustroju.

Celem pracy była ocena przydatności oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów uzyskanych bezpośrednio z posiewu krwi na płynne podłoża namnażające. W tym retrospektywnym badaniu porównano uzyskane wyniki z wynikami antybiogramów wykonanymi standardowymi metodami, zgodnymi z obowiązującymi standardami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) (9,15).

MATERIAŁ I METODY

Do analizy wybrano wyniki oznaczeń lekowrażliwości drobnoustrojów izolowanych z krwi od pacjentów hospitalizowanych w Centrum Onkologii w Warszawie wykonanych metodą standardową i „przyspieszoną” w okresie od 01.01.2013r. do 30.09.2014r. Analiza dotyczyła szczepów pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczek niefermentujących, oraz szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. Do badań wybrano te przypadki, w których uzyskano wzrost drobnoustrojów w monokulturze.

Inkubację próbek krwi prowadzono w automatycznym systemie BacT/ALERT firmy bioMerieux. Krew pobrana do butelek z płynnym podłożem namnażającym była inkubowana i monitorowana przez 5 dni w temperaturze 37°C. W przypadku gdy aparat wskazał na wzrost drobnoustrojów, hodowlę z danej butelki posiewano na podłoża stałe: agar tryptozowo-sojowy+5% krwi baraniej (TSSA), agar czekoladowy (AC), podłoże McConkey'a (MC), Chapman'a (CH), Columbia z wit. K i 5% krwią baranią (C). Płytki inkubowano przez 18-24 godzin w temp. 37°C, podłoża TSSA, AC w atmosferze 5% CO₂, natomiast płytki z podłożem MC i CH w warunkach tlenowych. Materiał posiany na podłoże Columbia inkubowany był w warunkach beztlenowych przez 5 dni.

Jednocześnie z posiewem hodowli na podłoża stałe wykonywano preparat bezpośredni barwiony metodą Grama na podstawie którego oceniany był rodzaj flory bakteryjnej. Równolegle przenoszono 5 ml płynnej hodowli do próbki wirowniczej i wirowano przez 10 minut przy 3000 obrotach/min. Następnie pobierano wymazówkę osad znajdujący się na granicy z supernatantem aby wykonać zawiesinę bakterii o gęstości 0,5 w skali McFarlanda w 0,85% roztworze NaCl (sól fizjologiczna).

Lekowrażliwość w metodzie „przyśpieszonej” oznaczano metodą dyfuzyjno-krażkową i w zależności od oceny preparatu dobierany był odpowiedni panel antybiotykowy. Dla pałeczek Gram-ujemnych były to: piperacylina/tazobaktam, amoksyacylina/kw. klawulanowy, cefotaksym, ceftazydim, cefepim, imipenem, meropenem, ciprofloksacyna, lewofloksacyna, gentamycyna, amikacyna, netylmycyna, ertapenem, trimetoprim-sulfametoksazol. Dodatkowo, stosowano test dwóch krążków (DDST) w celu potwierdzenia wytwarzania przez drobnoustroj beta-laktamaz typu ESBL. Do oceny lekowrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich panel antybiotykowy obejmował: cefoksytynę, erytromycynę, klindamycynę, ciprofloksacynę, gentamycynę, amikacynę, netylmycynę i linezolid.

Po uzyskaniu wzrostu drobnoustrojów na podłożach stałych prowadzono identyfikację izolatów stosując następujące testy firmy bioMerieux: ID 32 E, rapid ID 32 E, ID 32 GN, API 20 E, API 20 NE, ID 32 Staph i API Staph w systemie ATB oraz karty GN i GP w systemie VITEC 2 Compact. W przypadku zakażeń gronkowcowych stosowano testy dodatkowe: „clumping factor” firmy bioMerieux, osocze królicze firmy Biomed do wykrywania koagulazy niezwiązanej oraz zdolność do wytwarzania DNA-zy.

Lekowrażliwość w metodzie standardowej wyhodowanych szczepów oznaczano zgodnie z obowiązującymi standardami w diagnostyce mikrobiologicznej:

- metodą dyfuzyjno-krażkową zgodnie z zaleceniami EUCAST (5,12)
- stosując karty P-580, P-259, P-260 w systemie VITEC 2 Compact firmy bioMerieux
- oznaczając MIC za pomocą E-testów firmy bioMerieux

Wyniki dla obu metod zostały przedstawione w trzech kategoriach, zgodnie z zaleceniami EUCAST (5, 12): szczep wrażliwy – S, średniowrażliwy – I, oporny – R.

WYNIKI

Analizie poddano wyniki oznaczania lekowrażliwości 378 drobnoustrojów wyhodowanych z krwi, w tym: *Escherichia coli* 78 (20,6%), *Klebsiella pneumoniae* 45 (11,9%), *Enterobacter cloacae* 20 (5,3%), inne z rodziny *Enterobacteriaceae* 14 (3,7%), *Pseudomonas aeruginosa* 25 (6,6%), *Acinetobacter baumannii* 10 (2,6%), *Staphylococcus aureus* 41 (10,8%), *Staphylococcus* koagulazo-ujemny 145 (38,3%). Drobnoustroje podzielono na

dwie grupy: pałeczki Gram – ujemne (192 szczepy) i *Staphylococcus sp.* (186 szczepów), co związane było z różnicami w doborze antybiotyków.

W ocenie korelacji wyników lekowrażliwości wyhodowanych szczepów uzyskanych dwiema metodami zastosowano następujące kategorie: bardzo duży błąd (w standardowej metodzie uzyskano wynik R, a w „przyspieszonej” S), duży błąd (odpowiednio standardowa metoda S a „przyspieszona” R), mały błąd (gdy zmiana nastąpiła z S/R na I lub odwrotnie), oraz na wyniki zgodne.

Porównując wyniki lekowrażliwości pałeczek Gram-ujemnych (Tabela 1) oraz gronkowców (Tabela 2) na poszczególne antybiotyki uzyskano zgodność w obydwu metodach na poziomie od 90,1% do 100%. W przypadku pałeczek Gram-ujemnych najwięcej było małych błędów - 3,5%, natomiast duże błędy stanowiły 0,8%, a bardzo duże błędy 0,4% liczby oznaczeń dla wszystkich antybiotyków. Najwięcej błędnych oznaczeń zaobserwowano w przypadku TZP (9,9%) oraz AN (9,4%). Wyniki w 100% zgodne były jedynie dla CTX. W przypadku gronkowców odsetek błędnych oznaczeń był niski i wynosił tylko 2,7%, ale najwięcej było dużych błędów (1,3%). Znacznie mniej stwierdzono bardzo dużych błędów (0,8%) oraz małych błędów (0,6%). Najwięcej bardzo dużych błędów zaobserwowano w przypadku NET (3,8%). Najniższą zgodność u *Staphylococcus sp.* zaobserwowano dla AN (91,1%) i NET (94,1%), natomiast dla LZD i E wyniki były w stu procentach zgodne.

Tabela 1. Porównanie zgodności wyników oznaczania lekowrażliwości pałeczek Gram-ujemnych na poszczególne antybiotyki w obydwu metodach.

Antybiotyk	*Bardzo duży błąd	*Duży błąd	*Mały błąd	Wyniki zgodne	Liczba oznaczeń
TZP	2 (1%)	-	17 (8,9%)	173 (90,1%)	192
AMC	2 (1,3%)	5 (3,2%)	1 (0,6%)	149 (94,9%)	157
CTX	-	-	-	157 (100%)	157
CAZ	-	-	8 (4,2%)	184 (95,8%)	192
FEP	1 (0,5%)	-	10 (5,2%)	181 (94,3%)	192
IPM	-	-	5 (2,6%)	187 (97,4%)	192
MEM	-	-	6 (3,1%)	186 (96,9%)	192
CIP	-	1 (0,5%)	12 (6,3%)	179 (93,2%)	192
LEV	2 (1%)	-	5 (2,7%)	185 (96,3%)	192
GM	-	6 (3,1%)	4 (2,1%)	182 (94,8%)	192
AN	-	3 (1,6%)	15 (7,8%)	174 (90,6%)	192
NET	1 (0,5%)	4 (2,1%)	4 (2,1%)	183 (95,3%)	192
ETP	1 (0,6%)	-	1 (0,6%)	155 (98,8%)	157
SXT	1 (0,6%)	4 (2,6%)	1 (0,6%)	151 (96,2%)	157
SUMA	10 (0,4%)	21 (0,8%)	89 (3,5%)	2428 (95,3%)	2548

(TZP-piperacylina/tazobaktam, AMC-amoksycylina/kw.klawulanowy, CTX-cefotaksym, CAZ-ceftazydym, IPM-imipenem, MEM-meropenem, CIP-ciprofloksacyna, LEV-lewofloksacyna, GM-gentamycyna, AN-amikacyna, NET-netylmicycyna, ETP-ertapenem, SXT-ko-trimoksazol,

*Bardzo duży błąd – zmiana kategorii z S na R, duży błąd – zmiana kategorii z R na S, mały błąd – zmiana kategorii z S na I lub I na R)

Tabela 2. Porównanie zgodności wyników oznaczania lekowrażliwości bakterii z rodzaju *Staphylococcus* na poszczególne antybiotyki w obydwu metodach.

Antybiotyk	*Bardzo duży błąd	*Duży błąd	*Mały błąd	Wyniki zgodne	Liczba oznaczeń
FOX	1 (0,5%)	-	-	185 (99,5%)	186
E	-	-	-	186 (100%)	186
DA	-	5 (2,7%)	-	181 (97,3%)	186
CIP	1 (0,5%)	2 (1,1%)	-	183 (98,4%)	186
GM	-	5 (2,7%)	-	181 (97,3%)	186
AN	3 (1,7%)	4 (2,1%)	9 (4,8%)	170 (91,4%)	186
NET	7 (3,8%)	4 (2,1%)	-	175 (94,1%)	186
LZD	-	-	-	186 (100%)	186
SUMA	12 (0,8%)	20 (1,3%)	9 (0,6%)	1447 (97,3%)	1 488

(FOX-cefoksytyna, E-erytromycyna, DA-klindamycyna, CIP-ciprofloksacyna, GM-gentamycyna, AN-amikacyna, NET-netilmycyna, LZD-linezolid)

*Bardzo duży błąd – zmiana z kategorii S na R, duży błąd – zmiana z kategorii R na S, mały błąd – zmiana z kategorii S na I lub I na R)

DYSKUSJA

Wychodząc z założenia, że niezależnie od zastosowanej metody oznaczenia lekowrażliwości wyniki powinny być zbieżne, porównywano lekowrażliwość szczepów wykonaną bezpośrednio z hodowli na podłożu namnażającym stosując metodę dyfuzyjno – krążkową (tzw. metodą „przyśpieszoną”), z wynikami oznaczeń uzyskanymi metodami standardowymi dla wyhodowanych szczepów. Metoda dyfuzyjno – krążkowa jest zalecana jako metoda wiarygodna na etapie wykonywania antybiogramu „przyśpieszonego” i jest proponowana min. przez *Doern* wsp. (5) jako uzupełnienie toku postępowania diagnostycznego w przypadku zakażeń krwi. Dzięki wykonaniu przyśpieszonego antybiogramu bezpośrednio z hodowli na podłożu płynnym uzyskujemy informację o lekowrażliwości średnio 18-24 godz. wcześniej niż w metodzie standardowej (13,23). Skutkuje to wcześniejszym wdrożeniem antybiotykoterapii celowanej na co wskazywali między innymi *Kerremans* i wsp. (13). Według *Sahin* i wsp. (24) wynik lekowrażliwości powinien być dostępny dla lekarza klinicysty w określonych ramach czasowych. W swojej pracy *Barenfanger* i wsp. (1) podkreślali, że wcześniejsza informacja na temat wrażliwości drobnoustrojów ma istotny wpływ na długość pobytu w szpitalu oraz na koszty jakie generuje pacjent. Wczesne wykrycie, szybkie oznaczenie lekowrażliwości wyhodowanego drobnoustroju oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia redukuje śmiertelność wśród pacjentów z sepsą z 15,3% do 8,8% (5).

W ocenie uzyskanych wyników z poszczególnymi antybiotykami widoczna jest wysoka zgodność oznaczeń lekowrażliwości, która dla pałeczek Gram-ujemnych wynosi 95,3% a dla *Staphylococcus* sp. 97,3% . Wyniki te są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (8,10,11,12). Analiza błędów wykazała, że najczęstsza była zmiana kategorii z wrażliwy/oporny na średniowrażliwy lub odwrotnie (tzw. mały błąd), natomiast przypadki wystąpienia bardzo dużego błędu są sporadyczne (13,14). W szczegółowej ana-

lizie widać, że najczęściej niezgodności wystąpiło w przypadku oznaczania wrażliwości drobnoustrojów na aminoglikozydy oraz na piperacylinę/tazobaktam i amoksycylinę/kw. klawulanowy, co również potwierdzają prace innych autorów (22).

Na wystąpienie niezgodności wpływ może mieć w metodzie „przyspieszonej” brak zwalidowanej metody uzyskania inokulum – zawiesiny bakterii potrzebnej do wykonania antybiogramu, na co zwrócili uwagę w swej pracy *Johnson* i wsp. (12).

Biorąc pod uwagę korzyści jakie dają tzw. przyspieszone antybiogramy (5, 24), wskazane jest stosowanie tej procedury przy wyhodowaniach drobnoustrojów z krwi. Jednocześnie należy dążyć do jej udoskonalenia, zwłaszcza do standaryzacji metody otrzymywania inokulum. Wynik taki należy traktować jednak jako orientacyjny i nie zwalnia on z wykonania lekowrażliwości wyizolowanego szczepu metodami standardowymi.

PIŚMIENNICTWO

1. *Barenfanger J, Drake C, Kacich G.* Clinical and financial Benefits of rapid Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Cl Microbiol* 1999; 37: 1415-8.
2. *Bazzi AM, Rabaan AA, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA.* Direct identification and susceptibility testing of positive blood cultures using high speed cold centrifugation and Vitek II system. *J Infect Public Health* 2016; 10: 299-307.
3. *Chapin KC, Musgnug MC.* Direct susceptibility testing of positive blood cultures by using Sensititre broth microdilution plates. *J Cl Microbiol* 2003; 41(10): 4751-4.
4. *Chen JR, Lee SY, Yang BH, Lu JJ.* Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41: 259-64.
5. *Doern G. V, Vautour R, Gaudet M, Levy B.* Clinical Impact of rapid In Vitro Susceptibility Testing and Bacterial Identification. *J Cl Microbiol* 1994; 32(7): 1757-62.
6. *Durnaś B.* Zakażenia w oddziałach onkologicznych. W: Postacie kliniczne zakażeń szpitalnych. Red. Dzierżanowska D. Wydawnictwo α – medica press 2007; 81-114.
7. *Duszyńska W.* Monitorowanie kliniczne zakażeń szpitalnych. W: Zakażenia w intensywnej terapii. Red. Szubert FH. Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2000; 32-46.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): Guidance Documents in Susceptibility Testing. Direct antimicrobial susceptibility testing. 2012. (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Direct_testing_guidance_note_Feb2012.pdf)
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1, valid from 2017-03-10(http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf)
10. *Finberg R.* Zakażenia u chorych na nowotwory. W: Harrison. Choroby zakaźne. Wydawnictwo Czelej 2012; 148-64.
11. *Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 159-66.
12. *Johnson J. E, Washington A,* Comparison of Direct and Standardized Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 10: 211-4.

13. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, Vos MC. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing testin reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 428-35.
14. Kong H, Zhang S, Chen X, Zhang W, Yang Q, Fu Y, Wang Y, Li X. Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Blood Cultures of Gram-negative I Gram-positive Isolates. *Clin Lab* 2013; 59: 1-6.
15. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Publications/Disk_diffusion_paper_printed_version_March_2014.pdf)
16. Menon V, Lahans S, Janto C, Lee A. Utility of direct susceptibility testing on blood cultures: is it still worthwhile? *J Med Microbiol* 2016; 65: 501-9.
17. Munford R.S.: Posocznica i wstrząs septyczny. W: Harrison. Choroby zakaźne. Wydawnictwo Czelej 2012: 209-23.
18. Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV. Detection and Treatment of Bloodstream Infection: Laboratory Reporting and Antimicrobial Management. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 495-7.
19. Nelovkov A, Pirozkova L, Ivanova M, Kolesnikova V. Direct blood culture antimicrobial susceptibility testing in an East-Tallinn central hospital, Estonia. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 2012.
20. Nguyen H.B, Rivers E.P, Abrahamian F.M, Moran G.J, Abraham E, Trzeciak S, Huang D.T, Osborn T, Stevens D, Talan D.A. Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Ann Emerg Med* 2006; 48: 28-54.
21. Noman F, Jehan A, Ahmed A. Reliability of Direct Sensitivity Determination of Blood Cultures. *J Coll Physicians Surg Pak* 2008. 2008: 660-1.
22. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, Musser JM. Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *J Infect* 2014; 69: 216-25.
23. Rothman M, Levy M, Dellinger RP, Jones SL, Fogerty RL, Voelker KG, Gross B, Marchetti A, Beals IV J. Sepsis as Two Problems: Identifying Sepsis at Admission and Predicting Onset in the Hospital using an EMR-based Acuity Score, *J Crit Care* 2016 (doi:10.1016/j.jcrc.2016.11.037).
24. Sahin I, Sencan I, Kaya D, Oksuz S, Gulcan A. Evaluation of Direct and Standard Antimicrobial Susceptibility Testing Methods on Some Bacteria isolated from automated Blood Cultures. *Turk J Infect* 2003: 301-6.
25. Stoller J, Halpin L, Weis M, Aplin B, Weikai Q, Georgescu C, Nazzal M. Epidemiology of severe sepsis:2008-2012. *J Crit Care* 2016;31: 58-62.

Otrzymano: 22 X 2017 r.

Adres Autora: 02-781 Warszawa, ul. Roentgena 5, Zakład Mikrobiologii Klinicznej

e-mail: zmk@coi.waw.pl

Ocena częstości występowania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek *Escherichia coli* (VTEC) u osób z wybranych grup populacji polskiej

Seroprevalence of antibodies against verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in individuals from selected groups of the Polish population

Waldemar Rastawicki, Kornelia Gielarowicz, Anna Chróst

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego
Zakładu Higieny w Warszawie

Oceniono częstość występowania przeciwciał dla LPS oraz rekombinowanych białek werotoksycznych pałeczek *E. coli* u osób z wybranych grup populacji polskiej. Przeprowadzone badania wykazały, że u kilkunastu procent klinicznie zdrowych osób oraz jeszcze częściej u osób dorosłych z zaburzeniami ze strony układu pokarmowego, stwierdza się występowanie przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* z grupy O157 i non-O157. Obecność przeciwciał dla rekombinowanych białek Tir, intyminy i werotoksyny STX-2b stwierdzano tylko u około 6% procent dzieci i osób dorosłych z objawami ze strony układu pokarmowego oraz sporadycznie u osób zdrowych.

Słowa kluczowe: werotoksyczne *E. coli*, VTEC, występowanie przeciwciał, Polska

ABSTRACT

Introduction: The aim of the study was to investigate the frequency of antibodies against verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in individuals from selected groups of the Polish population.

Materials and Methods: Serum samples collected from 388 patients with gastrointestinal disorders, 142 patients with reactive arthritis, 172 forest workers, 43 pregnant women and 172 blood donors were tested by in-house ELISA for the presence of antibodies to VTEC. As the antigen in ELISA were used LPS of *E. coli* serotype O157 and non-O157 (O26, O111, O121, O145) as well as recombinants proteins: verocytotoxin Stx-2b, intimin and Tir.

Results: A dozen or so of clinically healthy individuals had antibodies for LPS *E. coli* O157 and non-O157. There were no significant differences in the incidence of these antibodies, depending on the group of healthy subjects. Antibodies to LPS of *E. coli* O157 and non-O157 were found most commonly in adults with gastrointestinal symptoms (39.1% and 36.9%, respectively). In children and adolescents with abdominal pain and/or diarrhea and adults with arthritis, antibod-

ies to LPS were detected at a similar frequency as in healthy subjects. It is noteworthy, however, that in many cases elevated antibody levels for LPS *E. coli* O157 and non-O157 were detected simultaneously in the same serum samples. The presence of antibodies to recombinant Tir proteins, intimine and verocytotoxin Stx-2b was found in approximately 6% of children and adults with gastrointestinal symptoms and occasionally in healthy individuals.

Conclusions: Antibodies to LPS of VTEC are very common in patients with gastrointestinal disorders as well as in healthy individuals. However, due to the possibility of cross-reactions there is a need to use for epidemiological study a more specific antigens, based on the recombinant proteins of verotoxin-producing *E. coli*. The presence of antibodies to specific, recombinant VTEC proteins is found in less than 1.0% of clinically healthy individuals, indicating the low spread of these infections in the Polish population.

Key words: verocytotoxin-producing *E. coli*, VTEC, seroprevalence, Poland

WSTĘP

Werotoksyczne pałeczki *E. coli* (VTEC) odpowiedzialne są za występowanie zatruc pokarmowych, krwotocznego zapalenia okrężnicy, zespołu hemolityczno-mocznicowego (haemolytic uremic syndrome - HUS), czy małopłytkowej plamicy zakrzepowej (thrombotic thrombocytopenic purpura – TTP). Szczególnie niebezpiecznym powikłaniem zakażenia werotoksycznymi pałeczkami *E. coli* u małych dzieci jest HUS, definiowany jako triada objawów klinicznych: niedokrwistość hemolityczna z fragmentacją krwinek czerwonych, małopłytkowość i ostra niewydolność nerek (3, 11, 17).

Pałeczki VTEC należą do różnych grup serologicznych, najczęściej do grupy O157, rzadziej do innych, umownie określanych mianem non – O157, takich jak: O26, O103, O111, O121, O145 czy O104. Do wywołania pełnych objawów zakażenia konieczne jest posiadanie przez te szczepy różnych czynników zjadliwości, w tym przede wszystkim werotoksyny I i/lub II, kodowanych na mobilnym elemencie genetycznym (fagu) oraz intyminy, białka Tir, białka Esp czy hemolizyny (8, 9, 10).

Naturalnym rezerwuarem werotoksycznych szczepów *E. coli* jest przewód pokarmowy przeżuwaczy, głównie bydła. Drobnoustroje te, stanowiące naturalną mikroflorę ich przewodu pokarmowego, trafiają wraz z odchodami do gleby i wody, gdzie mogą się utrzymywać przez okres od kilku tygodni do kilkunastu miesięcy. Człowiek zakaża się tymi drobnoustrojami spożywając skażoną żywność, przede wszystkim surową, niedogotowaną wołowinę, niepasteryzowane mleko, skażone surowe warzywa, kiełki, czy też pijąc skażoną wodę (17).

Diagnostyka zakażeń wywoływanych przez werotoksyczne pałeczki *E. coli* sprowadza się głównie do zastosowania metod hodowlanych, polegających na izolacji bakterii z próbek kału pacjenta i następnie określeniu ich chorobotwórczych właściwości (8, 9). Trzeba mieć jednak na uwadze, że pałeczki VTEC ze względu na bardzo krótki okres przebywania w układzie pokarmowym (kilka dni), morfologiczne podobieństwo do innych niechorobotwórczych pałeczek *E. coli* i częstej utraty genu kodującego werotoksynę w wyniku pasażowania, są trudne do izolacji w warunkach rutynowo prowadzonej diagnostyki bakteriologicznej. Z tego względu poszukiwanie swoistych przeciwciał może być

przydatne zarówno w rutynowej, bieżącej diagnostyce jak również w retrospektywnych badaniach dotyczących rozpowszechnienia zakażeń wywoływanych przez pałeczki VTEC w populacji.

Celem badań była ocena częstości występowania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek *E. coli* u osób z wybranych grup populacji polskiej.

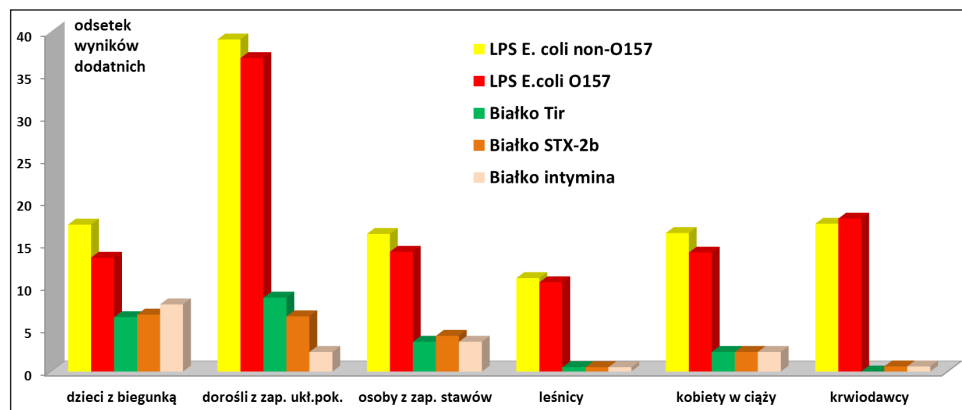
MATERIAŁ I METODY

Badane grupy osób. Przedmiotem badań były próbki surowicy uzyskane od 917 osób, w tym: 342 próbki surowicy dzieci i młodzieży z bólami brzucha i/lub biegunką, 46 próbek surowicy osób dorosłych z objawami ze strony układu pokarmowego, 172 próbki surowicy leśników zamieszkających na terenach wiejskich, 142 próbki surowicy osób dorosłych z zapaleniem stawów, 43 próbki surowicy kobiet w ciąży i 172 próbki surowicy krwiodawców.

Odczyn ELISA. Badania przeprowadzono pośrednim testem immunoenzymatycznym ELISA zgodnie z procedurą podaną uprzednio (14, 15). Odczyn wykonywano na polistyrenowych płytkach Maxi-Sorp firmy Nunc opłaszczonych zawiesiną rekombinowanych białek oraz lipopolisacharydów. Rekombinowane białko Tir, fragment białka intyminy i werocytotoksynę 2b uzyskano metodami inżynierii genetycznej przy użyciu wektora pET30Ek/LIC firmy Novagen i oczyszczono metodą chromatografii metalopowinowactwa (IMAC) przy wykorzystaniu złoża Ni^{2+} - IDA (His – Bind Resing firmy Novagen). Preparaty lipopolisacharydów uzyskano zmodyfikowaną metodą Boivina ze szczepów *E. coli* należących do grupy serologicznej O157 i non-O157 (O26, O111, O121 oraz O145). Wartość diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał wyliczano ze średniej arytmetycznej wartości poziomu przeciwciał oznaczonych w próbkach surowicy osób klinicznie zdrowych powiększonej o 2 odchylenia standardowe. W badaniach zastosowano koniugaty firmy Dako (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/IgG/IgM/HRP).

WYNIKI

Dane dotyczące częstości występowania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek *Escherichia coli* (VTEC) u osób z wybranych grup populacji polskiej przedstawiono na rycinie 1. Przeprowadzone badania wykazały, że u kilkunastu procent klinicznie zdrowych osób stwierdzono występowanie przeciwciał, w jakiegokolwiek klasie immunoglobulin, dla LPS pałeczek *E. coli* z grupy O157 i non-O157. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania tych przeciwciał w zależności od badanej grupy osób zdrowych. Przeciwciała dla LPS pałeczek *E. coli* O157 i non-O157 stwierdzano najczęściej u osób dorosłych z objawami ze strony układu pokarmowego (odpowiednio u 39,1% oraz 36,9% badanych osób). U dzieci i młodzieży z bólami brzucha i/lub biegunką oraz osób dorosłych z zapaleniem stawów przeciwciała dla LPS wykrywano z podobną częstością jak u osób zdrowych. Na uwagę zasługuje fakt, że w wielu przypadkach podwyższony poziom przeciwciał dla LPS *E. coli* O157 i non-O157 wykrywano jednocześnie w tych samych próbkach surowicy. Obecność przeciwciał dla rekombinowanych białek Tir, intyminy i toksyny Stx-2b stwierdzano u około 6% procent dzieci i osób dorosłych z objawami ze strony układu pokarmowego oraz sporadycznie u osób zdrowych.



Ryc. 1. Częstość występowania przeciwciał dla lipopolisacharydów i rekombinowanych białek werotoksycznych pałeczek *E. coli* (VTEC) u osób z wybranych grup populacji polskiej.

DYSKUSJA

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że przeciwciała dla LPS pałeczek *E. coli* należących do serotypów charakterystycznych dla VTEC wykrywane są dość powszechnie zarówno u osób zdrowych, dzieci z biegunką jak i zwłaszcza u osób dorosłych z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego (16). Trzeba mieć jednak na uwadze, że z powodu ograniczonej swoistości lipopolisacharydów, istnieje duże ryzyko uzyskiwania fałszywie dodatnich, nieswoistych wyników w prowadzonych badaniach metodami serologicznymi. W prezentowanej pracy świadczy o tym nie tylko stosunkowo wysoki odsetek wyników dodatnich w grupie osób zdrowych, ale przede wszystkim fakt równoczesnego wykrywania, w wielu przypadkach, podwyższonego poziomu przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* należących do różnych grup serologicznych. Wysoki odsetek wyników dodatnich, uzyskany u osób dorosłych z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego, może wiązać się z różnego pochodzenia przewlekłymi stanami zapalnymi żołądka i jelit, co skutkuje produkcją przeciwciał reagujących krzyżowo z antygenem LPS. Podobne spostrzeżenia poczyniono już w uprzednio prezentowanej pracy, w której oceniano przydatność odczynu ELISA do poszukiwania przeciwciał dla lipopolisacharydów pałeczek VTEC u osób z zaburzeniami układu pokarmowego i zespołem hemolityczno-mocznicowym (14). W badaniach tych, surowice uzyskane od osób z jersiniozą, salmonelozą czy kamylobakteriozą często reagowały z antygenem LPS uzyskanym z różnych serotypów pałeczek *E. coli*. Występowanie krzyżowych reakcji pomiędzy przeciwciałami swoistymi dla LPS *E. coli* O157 a antygenami takich bakterii jak *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Vibrio cholerae* O1 Inaba, pałeczek *Salmonella* grupy N, oraz *Citrobacter freundii* czy *Escherichia hermanni* potwierdzone zostało także przez innych badaczy (2, 12).

W podsumowaniu uprzednio prezentowanej pracy, zasugerowano, że ze względu na możliwość wystąpienia krzyżowych reakcji oraz konieczność potwierdzania obecności swoistych czynników zjadliwości, istnieje potrzeba opracowania bardziej swoistych antygenów, opartych na charakterystycznych dla VTEC rekombinowanych białkach. Antygeny takie opracowano we własnym zakresie a ich przydatność w serodiagnostyce zakażeń wywołanych przez werotoksyczne pałeczki *Escherichia coli* (VTEC) u ludzi zaprezen-

wano w kolejnej pracy (15). Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność tak uzyskanych rekombinowanych białek w rutynowych badaniach diagnostycznych. Szczególnie przydatne okazało się oznaczanie w próbkach surowicy przeciwciał klasy IgG i/lub IgA dla rekombinowanego białka Tir. Postanowiono wtedy, że w następnym etapie badań wykorzystana się wysoce swoiste, rekombinowane białka pałeczek VTEC, do retrospektywnego poszukiwania swoistych przeciwciał u osób z różnych grup populacji polskiej.

Zastosowanie w aktualnie prezentowanej pracy odczynu ELISA z rekombinowanymi białkami wykazało, że tylko u niektórych z badanych osób podwyższony poziom przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* z grupy O-157 i non-O157 związany był z zakażeniem VTEC. Przeciwciała dla rekombinowanych białek stwierdzano u kilku procent osób z objawami ze strony układu pokarmowego i tylko sporadycznie u osób klinicznie zdrowych. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości wykrywania przeciwciał dla VTEC u mieszkańców wsi (leśników) oraz krwiodawców z Warszawy i okolic.

Kliniczne kryteria zakażenia VTEC obowiązujące w krajach Unii Europejskiej to wystąpienie biegunki i/lub bólów brzucha, natomiast do kryteriów laboratoryjnych zalicza się izolację szczepu *E. coli* wytwarzającego shiga- lub werotoksyny, wykrycie DNA genów kodujących shiga- lub werotoksyny bądź też wykrycie wolnych shigatoksyn. Według raportu EFSA w Europie w 2013 roku najwyższą zapadalność na zakażenie pałeczkami VTEC zanotowano w Irlandii (12,29/100 tysięcy mieszkańców), Holandii (7,06/100 tysięcy) oraz w Szwecji (5,77/100 tysięcy), przy średniej europejskiej 1,59/100 tysięcy osób (4). Najczęściej izolowano pałeczki VTEC z grupy serologicznej O157 (48,9% potwierdzonych serologicznie izolatów), następnie z grupy serologicznej O26 (12,8%), O103 (4,3%) oraz O145 (2,6%). W Polsce w 2013 roku, według tego samego źródła, zapadalność na zakażenie VTEC wynosiła poniżej 0,1/100 tysięcy mieszkańców i była jedną z najniższych w Europie. Jak wynika z danych Zakładu Epidemiologii NIZP-PZH (18) w latach 2010-2016 zarejestrowano w Polsce jedynie 40 przypadków zachorowań (32 osoby były hospitalizowane).

Dane dotyczące występowania zakażeń VTEC oparte są wyłącznie na kryteriach podanych powyżej. Badania serologiczne w kierunku diagnostyki zakażeń VTEC nie są powszechnie wykonywane i brak jest danych pokazujących częstość występowania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek *E. coli* u osób w poszczególnych krajach. Trzeba mieć na uwadze, że brak takich danych uniemożliwia rzetelną ocenę rozpowszechnienia zakażeń wywoływanych przez VTEC. Zakażenie to przebiega bowiem w wielu przypadkach bezobjawowo lub z mało charakterystycznymi objawami klinicznymi. Co więcej, również ze względu na problemy z izolacją pałeczek VTEC z próbek materiału klinicznego oraz z późniejszym potwierdzaniem obecności ich czynników zjadliwości w rutynowo prowadzonej mikrobiologicznej diagnostyce chorób zakaźnych przypuszczać należy, że oficjalna liczba rejestrowanych przypadków, zwłaszcza w Polsce, jest mocno zaniżona.

W dostępnym piśmiennictwie jest niewiele pozycji, w których opisano częstość występowania przeciwciał dla pałeczek VTEC u osób z różnych grup populacji. W swoich badaniach Quilliam i wsp. (13) wykazali obecność przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* z grupy O157 u 31 (3,3%) spośród 946 rolników w Anglii. Tylko u pięciu osób z podwyższonym poziomem przeciwciał obserwowano łagodne objawy zapalenia układu pokarmowego. Autorzy ci zwrócili uwagę na stosunkowo częste występowanie przeciwciał dla *E. coli* O157 u farmerów zajmujących się hodowlą bydła czy też korzystającym z własnych ujęć wody pitnej. Belongia i wsp. (1) wykryli obecność przeciwciał dla LPS pałeczek

E. coli O157:H7 u 17% dzieci zamieszkałych na farmach oraz 13% dzieci mieszkających poza farmami. Evans i wsp. (5) stwierdzili obecność przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* O157 u 22 z 1667 osób zamieszkałych na terenach wiejskich w Anglii. Guirro i wsp. (7) obecność przeciwciał dla toksyny Stx2 pałeczek VTEC wykryli odczynem western-blot u 46,1% pacjentów z HUS oraz 16,6% zdrowych osób w Brazylii. W innej pracy z kolei, nie wykryto u osób klinicznie zdrowych przeciwciał dla toksyn Stx, natomiast przeciwciała dla LPS pałeczek *E. coli* O157 wykrywano u 4% osób z tej grupy (6)

PODSUMOWANIE

1. Przeciwciała dla LPS pałeczek *E. coli* należących do serotypów charakterystycznych dla VTEC występują dość powszechnie zarówno u osób zdrowych, dzieci z biegunką jak i zwłaszcza u osób dorosłych z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego.
2. Wykazanie obecności przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* należących do określonych serotypów nie świadczy bezpośrednio o zakażeniu pałeczkami VTEC. Z tego powodu oraz ze względu na ograniczoną swoistość LPS, wyniki badań serologicznych z użyciem tych antygenów muszą być potwierdzane odczynem opartym na bardziej swoistych, rekombinowanych białkach.
3. Przeprowadzone badania przy użyciu wysoce swoistych, rekombinowanych białek wskazują, że werotoksyczne pałeczki *E. coli* mogą być odpowiedzialne za kilka procent przypadków chorobowych przebiegających pod postacią bakteryjnych schorzeń układu pokarmowego u osób w Polsce.
4. Obecność przeciwciał dla swoistych, rekombinowanych białek pałeczek VTEC stwierdzana jest u mniej niż 1,0% klinicznie zdrowych osób, co świadczy o niskim rozprzestrzenieniu się tych zakażeń w populacji polskiej.

PIŚMIENNICTWO

1. *Belongia EA, Chyou P, Greenlee RT.* Diarrhea incidence and farm-related risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* antibodies among rural children. JID 2003; 187: 1461-8.
2. *Chart H, Jenkins C.* The serodiagnosis of infections caused by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. J App Microbiol 1999; 86: 731-40.
3. *Chart H, Cheasty T.* Human infections with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 – 10 years of *E. coli* O157 serodiagnosis. J Med Microbiol 2008; 57: 1389-93.
4. EFSA. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013. EFSA Journal 2015; 13 (1): 3991.
5. *Evans J, Chalmers RM, Chart H.* Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. Europ J Epidemiol 2000; 16: 885-9.
6. *Greatorex JS, Thorne GM.* Humoral Immune Responses to Shiga-Like Toxins and *Escherichia coli* O157 Lipopolysaccharide in Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Healthy Subjects. J Clin Microbiol 1994; 32: 1172-8.
7. *Guirro M, Piazza RM, de Souza RL, Gurh BE.* Humoral immune response to Shiga Toxin 2 (Stx2) among Brazilian urban children with hemolytic uremic syndrome and healthy controls. BMC Infect Dis 2014; 14: 320-5.

8. Januszkiewicz A, Podsiadły E, Szych J i inni. Charakterystyka fenotypowych i genotypowych właściwości werotoksycznego szczepu *E. coli* O111 wyizolowanego od pacjenta z zespołem hemolityczno – mocznicowym. Med Dośw Mikrobiol 2010; 62: 319-30.
9. Januszkiewicz A, Chróst A, Wołkowicz T i inni. Ognisko wywołane przez anteroagregacyjny i werotoksyczny szczep *Escherichia coli* O104:H4 w Europie – postępowanie diagnostyczne w Polsce oraz charakterystyka szczepu. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 287-98.
10. Jenkins C, Chart H, Smith HR i inni. Antibody response of patients infected with Verocytotoxin producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the LEE locus. J Med Microbiol 2000; 49: 97–101
11. Kulkarni H, Goldwater P, Martin A i inni. *Escherichia coli* ‘O’ group serological responses and clinical correlations in epidemic HUS patients. Microbiol Infect Dis 2002; 25: 249-68.
12. Navarro A, Eslava C, Hernandez U i inni. Antibody responses to *Escherichia coli* O157 and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. Clin Diag Lab Immunol 2003; 10: 797-801.
13. Quilliam RS, Chalmers RM, Williams AP i inni. Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Escherichia coli* O157 in a Farming Population. Zoonoses Public Health. 2012; 59: 83-8.
14. Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N. Ocena przydatności odczynu immunoenzymatycznego ELISA do poszukiwania przeciwciał dla lipopolisacharydów enterokrwotocznych pałeczek *Escherichia coli* (EHEC) u osób z zaburzeniami układu pokarmowego i zespołem hemolityczno-mocznicowym. Med Dośw Mikrobiol 2014; 66: 161-75.
15. Rastawicki W, Śmietalska K, Chróst A, Gielarowiec K, Wołkowicz T. Wykorzystanie wybranych, rekombinowanych białek w serodiagnostyce zakażeń wywoływanych przez werotoksyczne pałeczki *Escherichia coli* (VTEC) u ludzi. Med Dośw Mikrobiol 2016; 68: 183-90.
16. Rastawicki W, Gielarowiec K, Chróst A. Ocena częstości występowania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek *Escherichia coli* u osób z wybranych grup populacji polskiej. Materiały Zjazdowe Konferencji Naukowej pt. „PTM wczoraj-dziś-jutro”, Kraków, 22-23 września 2017 r., strona 63.
17. Szych J. W etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruc pokarmowych. Pod redakcją Marka Jagielskiego. Biblioteka Diagnosty Laboratoryjnego. Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2011, str. 17-89.
18. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH, Główny Inspektorat Sanitarny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html.

Praca wykonana w ramach tematu naukowego nr 5/EM.1 na rok 2017, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Otrzymano: 17 X 2017 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Zmiany w kompozycji białek błony zewnętrznej szczepów *Escherichia coli* wywołane działaniem nanokompozytów srebra

Changes in the composition of outer membrane proteins of *Escherichia coli* strains caused by silver nanocomposites

Ewa Krzyżewska, Mateusz Speruda, Bartłomiej Dudek, Anna Kędziora,
Gabriela Bugła-Płoskońska

Rezultatem wykorzystania nanotechnologii w pozamedycznych sektorach przemysłu jest obecność na rynku konsumenckim szerokiego spektrum artykułów codziennego użytku, zawierających nanocząstki srebra - struktury o unikalnych właściwościach fizyko-chemicznych i wynikającym z nich działaniu antybakteryjnym. Powszechność występowania produktów tego typu budzi obawy w środowisku naukowym, zwłaszcza w świetle potencjalnego ryzyka rozwoju oporności wśród bakterii Gram-ujemnych. Celem tej pracy jest analiza porównawcza zmian w profilu elektroforetycznym białek osłon komórkowych między izolatami klinicznymi *E. coli* i ich wariantami powstałymi wskutek długotrwałej ekspozycji na subletalne dawki nanokompozytów srebra, różniących się właściwościami fizyko-chemicznymi (rodzajem i rozmiarem nośnika, zawartością, stopniem utlenienia oraz sposobem osadzania srebra na nośniku).

Słowa kluczowe: nanokompozyty srebra, białka błony zewnętrznej, *E. coli*

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to determine the role of outer membrane proteins in the resistance to silver nanocomposites. For this purpose we performed a comparative analysis of changes in the outer membrane proteome between *E. coli* clinical isolates and variants with reduced susceptibility to silver after prolonged exposure to sublethal doses of silver nanocomposites.

Materials and Methods: *Escherichia coli* 408, *E. coli* 555 and *E. coli* ATCC 11228 were subjected to sublethal doses of silver nanocomposites with different physicochemical properties (A-D). Outer membrane proteins were extracted according to the method described by Murphy and Bartos, then the SDS-PAGE was performed.

Results: Examined strains showed reduced susceptibility only to one tested silver nanocomposite. Electrophoretic analysis showed differences in protein profiles between the variants and wild type strains of *E. coli* 408 and *E. coli* ATCC 11228. No changes in the outer membrane profiles of *E. coli* 555 strains were observed.

Conclusions: Efficiency of silver nanocomposites depends on its physicochemical properties such as size, form and immobilization on inorganic carriers. Occurrence of reduced susceptibility to silver nanocomposites is correlated with disappearance, amount changes or synthesis of new proteins.

Keywords: silver nanocomposites, outer membrane proteins, *E. coli*

WSTĘP

Nanotechnologia jest obszarem nauki i inżynierii poświęconym materiałom o średnicy 10^{-9} metra i stanowi jedną z najbardziej rozwijających się dziedzin nauki w ostatnich latach (7). Techniki nanotechnologii umożliwiają manipulowanie cząstkami na poziomie atomów, dzięki miniaturyzacji nanoformy cechują się unikalnymi właściwościami fizycznymi, chemicznymi, optycznymi, a także wysoką aktywnością biologiczną. Nanocząstki charakteryzuje znacznie większy stosunek powierzchni do objętości w porównaniu z formą mikrometryczną, dzięki czemu ich działanie jest bardziej efektywne. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszą się nanocząstki srebra (AgNPs – *ang. silver nanoparticles*). Aktywność biologiczna AgNPs jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości nanostruktur: im mniejsza średnica cząstek, tym wyższa aktywność biologiczna. Niestety, nanocząstki metaliczne wykazują tendencję do agregacji, co wpływa na utratę właściwości fizycznych i chemicznych, czego następstwem jest obniżenie poziomu aktywności biologicznej. Efekt tworzenia klastrow może być zniwelowany poprzez immobilizację nanocząstek srebra na nieorganicznych nośnikach, głównie dwutlenku krzemu (SiO_2) i dwutlenku tytanu (TiO_2) (2, 9). We współczesnej medycynie związki srebra znalazły zastosowanie w leczeniu ran i oparzeń, jako komponent materiałów do produkcji cewników i implantów oraz w stomatologii, jako dodatek do wypełnień dentystycznych. Ponadto związki srebra zyskały dużą popularność i szerokie zastosowanie w branży niemedycejskiej. Stanowią one dodatek do materiałów z jakich produkuje się przedmioty codziennego użytku (pralki, deski sedesowe, tkaniny, klawiatury czy myszy komputerowe), jako czynniki hamujące namnażanie się drobnoustrojów na ich powierzchni. Z kolei związki zawierające nanocząstki srebra immobilizowane na nieorganicznych nośnikach uważa się za skuteczne środki dezynfekcyjne, które są stosowane na szeroką skalę w systemach dystrybucji wody pitnej (8, 14).

Jony srebra mają najwyższy poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej spośród wszystkich metali ciężkich i posiadają szerokie spektrum działania zarówno wobec komórek bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym zarówno gatunków tlenowych jak i beztlenowych (20). Ag^+ mają zdolność wiązania się ze ścianą komórkową bakterii, cytoplazmą czy też otoczkami bakteryjnymi. Zmiany w strukturze osłon zewnętrznych komórki prowadzą do ich destabilizacji i wzrostu przepuszczalności. Głównym miejscem oddziaływania srebra są komórkowe białka strukturalne i enzymatyczne, czyli białka pełniące podstawowe funkcje w prawidłowym funkcjonowaniu mikroorganizmu (16). Osłony komórkowe bakterii Gram-ujemnych są złożoną, wielowarstwową konstrukcją, która warunkuje charakterystyczny kształt oraz chroni mikroorganizmy przed zmiennymi warunkami środowiska zewnętrznego (21), w związku z czym jednym ze sposobów oceny wpływu nanocząstek na zdrowie człowieka i homeostazę ekosystemów jest ocena zmian wrażliwości bakterii na długotrwałe i podprogowe zawartości nanokompozytów srebra, mierzona zmianami zachodzącymi w proteomie błony zewnętrznej bakterii.

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę porównawczą zmian w profilu elektroforetycznym białek błony zewnętrznej pomiędzy szczepami dzikimi a szczepami po kontakcie z subletalnymi dawkami różnych nanoform srebra immobilizowanych na ditlenku tytanu.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne i nanokompozyty. W badaniach wykorzystano dzikie szczepy *Escherichia coli* wyizolowane od pacjentów hospitalizowanych (*E. coli* 408, *E. coli* 555) oraz szczep pochodzący z kolekcji ATCC (*E. coli* ATCC 11228). Do badań wykorzystano również szczepy o zmienionej wrażliwości, które otrzymano z badanych szczepów dzikich poprzez 6 dniową ekspozycję na podprogowe stężenie srebra zawartego w nanokompozytach, określone jako warianty danej próby (Tab. I i II), ustalone na podstawie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC, *ang. minimal inhibitory concentration*) – 0.5xMIC, 1xMIC oraz 4xMIC. Do badań wybrano te nanokompozyty, które spełniły wymagania fizyko-chemiczne oraz wykazały wysoką antybakteryjną aktywność (Tab. II) (6, 9). Szczegółową procedurę przygotowania oraz pełną charakterystykę nanokompozytów opisano w Kędziora i wsp. 2012 (9) oraz Kędziora i wsp. 2016 (6). Zmiana wrażliwości obserwowana była poprzez powtarzane określanie wartości MIC po zakończonej hodowli w narastającym stężeniu nanokompozytów srebra. W przypadku wybranych prób nanokompozytów zaobserwowano zmniejszoną wrażliwość bakterii na srebro (Tab. II).

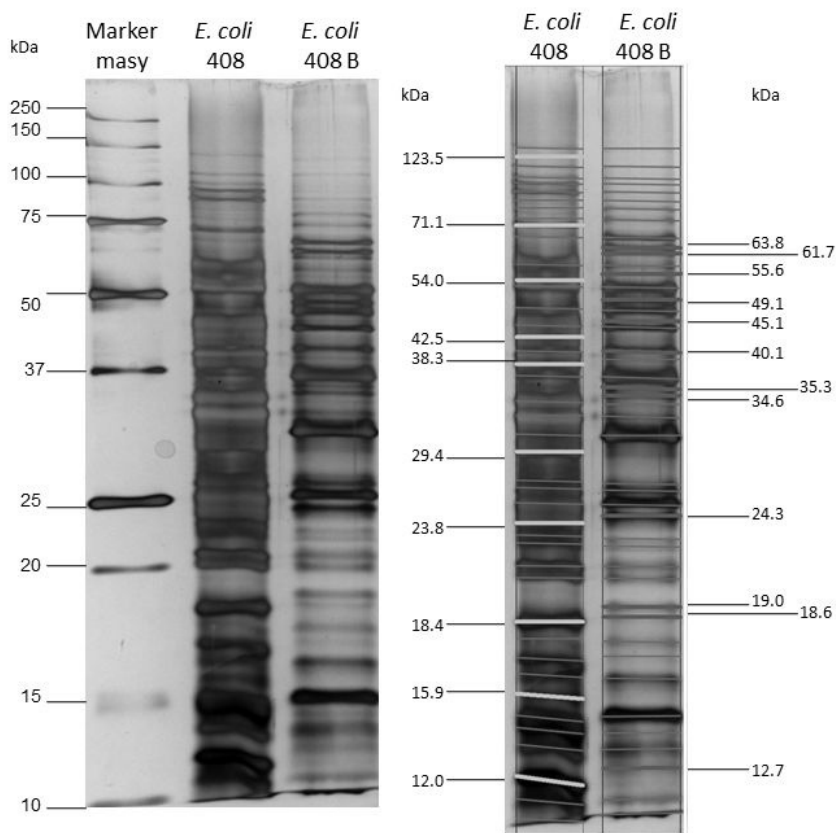
Izolacja białek błony zewnętrznej (OMPs) szczepów bakteryjnych. Izolację białek błony zewnętrznej (OMPs) przeprowadzono w oparciu o metodę Murphy i Bartos (15) z drobnymi modyfikacjami (3). Przed przystąpieniem do izolacji białek szczepy bakteryjne, u których zaobserwowano zmianę wrażliwości na nanokompozyty srebra, namnażano w 25 ml pożywki LB przez 18 godz. w 37°C. Następnie hodowlę zwirowano (4000 obr/min, 4°C, 20 min) i zawieszono w 1,25 ml 1 M octanu sodu (POCH), 1 mM β-merkaptetanolu (Merck). Następnie dodano 11,25 ml roztworu 5% Zwittergentu Z 3-14 (Calbiochem) z 0,5 M CaCl₂ (POCH). Mieszaninę inkubowano na mieszadle magnetycznym 1 godz. w temp. pokojowej. W celu wytrącenia kwasów nukleinowych bardzo powoli dodano 3,13 ml 96% zimnego etanolu (POCH). Mieszaninę zwirowano (17 000 obr/min, 4°C, 10 min) a następnie wytrącono białka dodając 46,75 ml 96% zimnego etanolu i ponownie zwirowano (17 000 obr/min, 4°C, 20 minut). Osad pozostawiono do wyschnięcia w temp. pokojowej, a następnie zawieszono w 2,5 ml buforu 50 mM Trizma-Base (Sigma-Aldrich), pH 8,0 zawierającego 0,05% Zwittergentu Z 3-14 i 10 mM EDTA (Sigma-Aldrich). Mieszaninę inkubowano w temp. pokojowej przez 1 godz. a następnie inkubowano przez noc w temp. 4°C. Następnie próbkę zwirowano (12 000 obr/min, 4°C, 10 min) i rozpipetowano OMPs obecne w supernatancie. Oznaczanie stężenia wyizolowanych OMPs wykonano z wykorzystaniem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

SDS-PAGE białek błony zewnętrznej. Rozdział wyizolowanych białek OMPs przeprowadzono wykorzystując technikę SDS-PAGE według metody Laemmli (10). Rozdziału dokonano w 12,5% żelu poliakrylamidowym o grubości 0,75 mm przy użyciu Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad), z wykorzystaniem zasilacza APELEX PS 9009XT w warunkach stałej mocy 1W, przez około 150 minut. Na gotowy żel naniesiono przygotowane wcześniej próby białek OMPs oraz marker masy Wide Range (MWR) Precision Plus Protein (Bio-Rad) o wielkościach molekularnych od 250 do 10 kDa, przygotowany

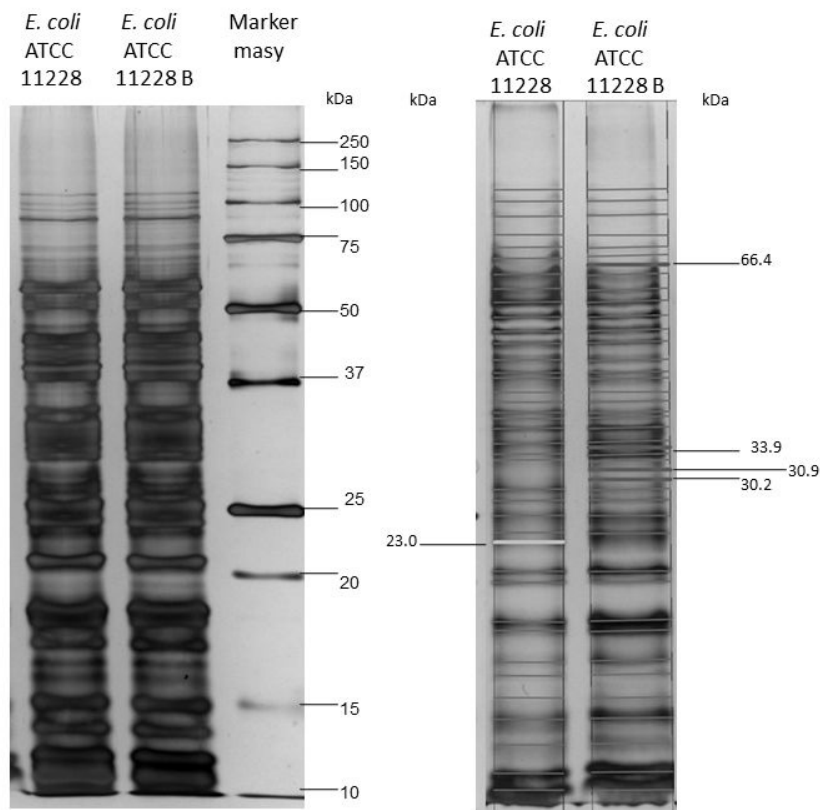
zgodnie z instrukcją zamieszczoną przez producenta. Uzyskane żele zostały zabarwione z wykorzystaniem metody srebrowej (5) oraz sfotografowane przy użyciu aparatu ChemiDoc MP System firmy Bio-Rad. Analizy białek dokonano przy użyciu programu Image Lab 4.1 (Bio-Rad).

WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych rozdzielów elektroforetycznych badanych szczepów dzikich i ich wariantów o zmniejszonej wrażliwości na srebro uzyskano profile białkowe osłon wykazujące istotne różnice pomiędzy obecnością białek OMPs w szczepie dzikim oraz odpowiadającym mu wariantcie poddanym długotrwałej ekspozycji na podprogowe stężenie srebra zawartego w nanokompozytach.



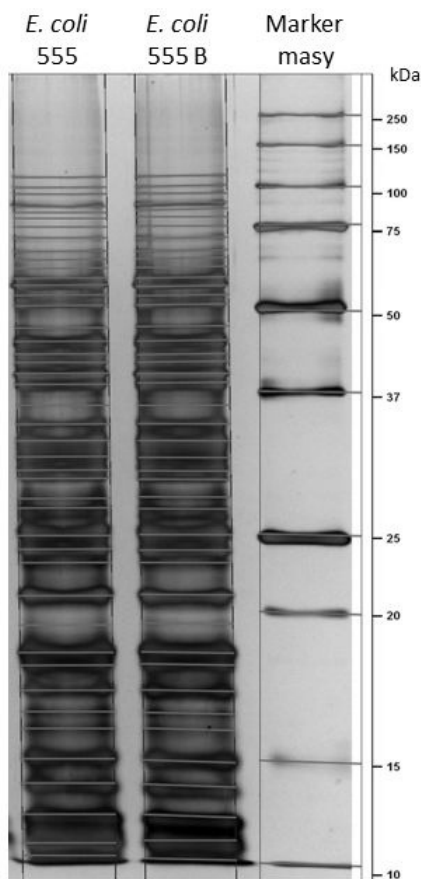
Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE oraz analiza mas molekularnych białek OMPs szczepu *E. coli* 408 i *E. coli* 408 wariant B.
ścieżka 1 – marker masy, ścieżka 2 - *E. coli* 408, ścieżka 3 - *E. coli* 408 wariant B. Na zdjęciu zaznaczono białka obecne tylko w szczepie dzikim *E. coli* 408 oraz białka obecne tylko w szczepie *E. coli* 408 wariant B.



Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE oraz analiza mas molekularnych białek OMPs szczepu *E. coli* ATCC 11228 i *E. coli* ATCC 11228 wariant B.
ścieżka 1 - *E. coli* ATCC 11228, ścieżka 2 - *E. coli* ATCC 11228 wariant B, ścieżka 3 – marker masy. Na zdjęciu zaznaczono białka obecne tylko w szczepie dzikim *E. coli* ATCC 11228 oraz białka obecne tylko w szczepie *E. coli* ATCC 11228 wariant B.

***E. coli* 408 i *E. coli* 408 wariant B.** Rozdział elektroforetyczny białek OMPs szczepu *E. coli* 408 (Ryc. 1) przedstawia znaczne zróżnicowanie profili białkowych szczepu dzikiego w porównaniu ze szczepem o zmniejszonej wrażliwości na srebro. W profilu białkowym osłon szczepu dzikiego *E. coli* 408 wykryto 43 białka odpowiadające masom w zakresie od 10,3 do 134,8 kDa. W szczepie *E. coli* 408 wariant B wykryto 45 białek w zakresie mas od 10,5 do 134,5 kDa. Po długotrwałym kontakcie z nanokompozytem B pojawiły się w profilu białkowym osłon nowe białka OMPs o masach: 63,8; 61,7; 55,6; 49,1; 45,1; 35,3; 34,6; 24,3; 19; 18,6; 12,7 kDa. Z kolei prążki białkowe odpowiadające masom: 123,5; 71,1; 54; 42,5; 38,3; 29,4; 23,8; 18,4; 15,9; 12 kDa obecne w szczepie dzikim *E. coli* 408, nie występowały natomiast w szczepie *E. coli* 408 wariant B. Szczególną uwagę należy zwrócić na nowe białka w wariantcie o zmniejszonej wrażliwości na srebro odpowiadające masom: 63,8; 61,7; 35,3 i 34,6 kDa. Dla innych białek nie zauważono istotnych różnic pomiędzy porównywanymi szczepami. W rozdziale elektroforetycznym można zaobserwować

różnice w intensywności zabarwienia uzyskanych profili białkowych. Doszło do wzrostu syntezy białek o masie: 67; 52,1; 47,1; 36,5; 30,8; 25,2 kDa w szczepie poddanym długotrwałej ekspozycji na srebro w porównaniu ze szczepem dzikim. Dodatkowo w wariancie, w porównaniu ze szczepem dzikim, zmniejszoną intensywnością zabarwienia charakteryzowały się białka o masach: 101,5; 96,9; 90,5; 58,4; 44,4; 34; 32,7; 23; 22,4; 20,9; 20,2; 17,1; 14,6; 13,7; 11,1 kDa.



Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE oraz analiza mas molekularnych białek OMP szczepu *E. coli* 555 i *E. coli* 555 wariant B.

ścieżka 1 – marker masy, ścieżka 2 - *E. coli* 555, ścieżka 3 - *E. coli* 555 wariant B.

***E. coli* ATCC 11228 i *E. coli* ATCC 11228 wariant B.** Proteinogram po przeprowadzonej elektroforezie SDS-PAGE (Ryc. 2) wykazał niewielką zmienność w profilach białkowych dwóch porównywanych prób białek OMPs. Różnice w profilach białkowych były mniejsze niż między szczepem *E. coli* 408 oraz jego wariantem o zmienionej wrażliwości na srebro. W profilu białkowym osłon dzikiego szczepu *E. coli* ATCC 11228 wykryto 39 białek w zakresie mas od 11,2 do 119,7 kDa. W szczepie *E. coli* ATCC wariant B wykryto 42 białka,

których masy mieszczą się w zakresie od 11,2 do 120,2 kDa. Na podstawie przeprowadzonej elektroforezy wykazano w szczepie *E. coli* ATCC 11228 wariant B obecność nowych białek o masie molekularnej 66,4; 33,9; 30,9 i 30,3 kDa w porównaniu z profilem białkowym szczepu dzikiego. Z kolei prążek o masie 23 kDa występował w profilu białkowym osłon szczepu dzikiego, natomiast nie występował w wariancie o zmniejszonej wrażliwości na srebro. Wykazano także różnice w intensywności zabarwienia uzyskanych profili białkowych. Białka o masach: 23,6; 20,2; 18,5 i 15,5 kDa w szczepie *E. coli* ATCC 11228 wariant B charakteryzowały się większą intensywnością zabarwienia niż te same prążki w szczepie dzikim. Również w tym przypadku większa gęstość optyczna prążków uwidocznionych w żelu może świadczyć o intensywniejszej produkcji w komórce wskazanych białek.

***E. coli* 555 i *E. coli* 555 wariant B.** Rozdział elektroforetyczny białek OMPs nie wykazał zróżnicowania profili białkowych pomiędzy szczepem dzikim a wariantem o zmniejszonej wrażliwości na srebro (Ryc. 3). Zarówno w profilu białkowym osłon szczepu *E. coli* 555 jak i *E. coli* 555 wariant B wykryto 44 białka w zakresie mas od 117,6 do 10,7 kDa. Nie wykazano również istotnych różnic pomiędzy intensywnością zabarwienia białek w porównywanych profilach białkowych.

DYSKUSJA

Srebro dzięki znanym od dawna właściwościom bakteriobójczym oraz toksyczności w stosunku do szerokiego spektrum mikroorganizmów przykuło uwagę naukowców jako alternatywny czynnik zwalczania drobnoustrojów. Osiągnięcia w dziedzinie nanotechnologii umożliwiły syntezę nanocząstek srebra, które dzięki specyficznym właściwościom fizyko-chemicznym wykazują wysoką aktywność wobec lekoopornych szczepów bakterii stwarzających poważne problemy kliniczne, np. *Staphylococcus aureus* MRSA czy ampicylinooporna *E. coli* O157:H7 (11). Przeprowadzone badania prezentowane w niniejszej pracy są badaniami wstępnymi i miały na celu określenie zmian w profilu białek błony zewnętrznej bakterii po kontakcie z subletalnymi dawkami różnych nanoform srebra immobilizowanych na TiO_2 . Poszczególne nanokompozyty różniły się formą uporządkowania (amorficzny i krystaliczny TiO_2), rozmiarem nośnika, zawartością srebra, stopniem utlenienia srebra oraz sposobem osadzania srebra na nośniku (Tab. I). Wszystkie nanokompozyty srebra testowano wobec trzech szczepów bakteryjnych: *E. coli* 408, *E. coli* 555, *E. coli* ATCC 11228. Jednak zmniejszenie wrażliwości na srebro zaobserwowano tylko w przypadku jednej próby B, gdzie nanosrebro wielkości 20 nm osadzone zostało na amorficznym TiO_2 w ilości 10% (Tab. II). Z wariantów o zmienionej wrażliwości na srebro wyizolowano białka błony zewnętrznej i dokonano rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE w celu porównania zmian w profilu elektroforetycznym białek OMPs po kontakcie z subletalną dawką nanoformy srebra immobilizowanej na TiO_2 (9). Różnorodne warunki środowiska w tym również sztucznie zaadaptowane przez człowieka mogą wpływać na ekspresję białek błony zewnętrznej. Białka OMPs ze względu na peryferyczną lokalizację w komórce bakteryjnej biorą aktywny udział w przystosowaniu się do zmieniających się warunków środowiska bytowania oraz do adaptacji do nowych nisz ekologicznych. Obecność danego białka lub ich zespołu w komórce, a w przypadku prezentowanych w tej pracy analiz w błonie zewnętrznej może być związana z czasem ekspozycji, stężeniem substancji działającej na komórkę oraz innymi warunkami fizycznymi w jakich dany czynnik działa na komórkę odbiegającymi od warunków fizjologicznych, do których komórki bakteryjne są przystosowa-

ne. W wyniku odpowiedzi komórki bakteryjnej na obecność w środowisku antybiotyków czy metali ciężkich może dochodzić do zmiany w poziomie ekspresji pewnych OMPs (1, 7). Dane proteomiczne badań przeprowadzonych przez *Lok i współautorów* (12) wykazały, że krótka ekspozycja bakterii *E. coli* na bakteriobójcze stężenia nanocząstek srebra spowodowała nagromadzenie prekursorów białek błony zewnętrznej, które przy użyciu metody MALDI TOF MS oraz MS/MS zidentyfikowano jako OmpC, OmpF oraz OmpA.

Tabela I. Charakterystyka nanokompozytów srebra użytych do generowania szczepów o zmienionej wrażliwości (6,9). Legenda do prób: A (TiO_2/Ag^+) (9), B (TiO_2/Ag^0) (9), próba C ($\text{TiO}_{2a}/\text{Ag}^0$) (9), D ($\text{TiO}_{2a}/\text{Ag}^0$) (6).

Próba	Nośnik	Rozmiar nośnika (nm)	Zawartość srebra % (m/m)	Stopień utlenienia srebra	Rozmiar srebra (nm)	Sposób impregnacji srebrem	Piśmiennictwo
A	TiO_2 krystaliczny (anataz)	≤ 40	1	Ag^+	nie dotyczy	po syntezie nośnika	(9)
B	TiO_2 amorficzny	≤ 100	10	Ag^0	20	po syntezie nośnika	(9)
C	TiO_2 krystaliczny (anataz)	≤ 40	1	Ag^0	≤ 10	po syntezie nośnika	(9)
D	TiO_2 krystaliczny (anataz)	≤ 50	1,6	Ag^0	≤ 5	w trakcie syntezy nośnika	(6)

Badania własne również wykazują zmiany w poziomie produkcji niektórych białek OMPs. Długotrwały kontakt bakterii z podprogowymi stężeniami srebra zawartego w nanokompozytach wywarł wpływ na obraz profili białkowych badanych szczepów. W szczepie o zmniejszonej wrażliwości na srebro doszło do wytworzenia nowych białek OMPs oraz zaprzestania produkcji innych białek OMPs. Mechanizmy warunkujące oporność na metale ciężkie są mechanizmami złożonymi, ponieważ obecność jednego mechanizmu oporności nie zapewnia bakteriom pewnego przetrwania, dlatego powszechne jest występowanie wśród bakterii jednocześnie kilku mechanizmów warunkujących oporność na różne grupy związków. Oporność bakterii na metale ciężkie wynika głównie z obecności aktywnych pomp typu efflux. *Percival i współautorzy* wykazali, że wśród doświadczalnie wygenerowanych mutantów *E. coli* opornych na wzrastające stężenie Ag^+ działa system pomp typu efflux. Dodatkowo *Franke i współautorzy* wykazali, że zmniejszona przepuszczalność osłon komórkowych, wynikała z utraty głównych białek porynowych (4, 19).

Tabela II. Warianty o zmienionej wrażliwości na srebro (6,9).

Szczep bakteryjny	Próba			
	A	B	C	D
<i>Escherichia coli</i> 408	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> 555	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11228	-	+	-	-

(+) zmniejszenie wrażliwości na srebro, zaobserwowana poprzez zmianę wartości MIC.

Na podstawie przeprowadzonych badań możemy wywnioskować, że wrażliwość bakterii na nanokompozyty różni się pomiędzy przedstawicielami tego samego gatunku co pozwala wysnuć wniosek, że cecha ta nie jest specyficzna gatunkowo lecz indywidualną cechą każdego mikroorganizmu. Profile białkowe osłon szczepów *E. coli* 408, *E. coli* 555, *E. coli* ATCC 11228 po kontakcie z tą samą próbą nanokompozytu B pokazują różnice w poziomie syntezy białek błony zewnętrznej. Największe zróżnicowanie białek wykazuje szczep *E. coli* 408 B, u którego pojawiły się nowe białka o masach: 63,8; 61,7; 55,6; 49,1; 45,1; 35,3; 34,6; 24,3; 19; 18,6; 12,7 kDa. W przypadku szczepu *E. coli* ATCC 11228 o zmniejszonej wrażliwości na srebro pojawiły się nowe białka o masie molekularnej 66,4; 33,9; 30,9; i 30,3 kDa. Z kolei w szczepie *E. coli* 555 wariant B pomimo zmiany wrażliwości na srebro nie zaobserwowano różnic w profilu białkowym osłon w porównaniu ze szczepem dzikim. Brak różnic w profilach białkowych może być związany z ograniczeniami metody rozdzielania białek przy użyciu elektroforezy SDS-PAGE. Istnieje możliwość, że zmiana wrażliwości wynika z odmiennego mechanizmu działania tego preparatu skorelowanego z indywidualnymi cechami szczepu lub właściwościami fizyko-chemicznymi nanokompozytu srebra B.

Ditlenek tytanu występuje w przyrodzie w trzech odmianach krystalicznych, jako anataz, rutyl i brukit. Anataz ze względu na najwyższe właściwości fotokatalityczne pełni między innymi funkcję nośnika dla aktywnych biologicznie cząstek srebra. Promieniowanie UV jest niezbędnym czynnikiem do uzyskania właściwości katalitycznych krystalicznego TiO_2 . Informacje na temat biologicznej aktywności anatazu nie poddanego promieniowaniu UV oraz biologicznej aktywności amorficznego TiO_2 jako nośnika nanocząstek srebra są ubogie (9).

Dowiedziano, że decydujący wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową ma wielkość pojedynczych nanocząstek srebra, rozkład wielkości w obrębie próby oraz kształt nanocząstek. Według *Pal i współautorów* toksyczność nanocząstek srebra zależy od ich kształtu (17). Uważa się, że skuteczność nanocząstek jest tym wyższa im mniejszą średnicę mają nanocząstki srebra (13). *Panacek i współautorzy* wysnuli podobne wnioski testując różne rozmiary nanocząstek srebra wobec szczepów Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Najniższe wartości minimalnego stężenia hamującego uzyskano dla nanosrebra o najmniejszych rozmiarach (18).

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że również sposób osadzenia srebra na nośniku wpływa na aktywność biologiczną nanokompozytów. Badane szczepy *E. coli* zmieniły swoją wrażliwość tylko po ekspozycji na próbę B, w której srebro zostało osadzone na nośniku w postaci warstwy. W przypadku pozostałych testowanych nanokompozytów A, C i D, w których srebro zostało osadzone na nośniku w postaci nanoziaren, nie zaobserwowano zmiany wrażliwości badanych szczepów. Zawartość srebra w próbce również może być czynnikiem, który determinuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Zdania naukowców w tej kwestii są jednak podzielone. *Kędzióra i wsp.* (9) sugerują, że efekt bójczy nanokompozytów jest tym wyższy im mniejsza jest zawartość atomów srebra na powierzchni nośnika. Niewykluczone, że wiąże się to w efekcie z jego biodostępnością. W przeciwieństwie do *Thiel i wsp.* (22), którzy sugerują, że im większa zawartość atomów srebra na powierzchni próby tym większe właściwości bakteriobójcze nanokompozytu. Interesujące jest również to, że zmianę wrażliwości bakterii zaobserwowano tylko dla próby z największą testowaną zawartością (10,2%), próba B. Powyższe rozważania dowo-

dzą, że na ostateczną efektywność nanokompozytów składa się szereg czynników. Wpływ mają zarówno właściwości nośnika takie jak jego rozmiar czy postać, jak również cechy immobilizowanych cząstek srebra (stopień utlenienia srebra, procentowa zawartość srebra w próbce, rozmiar). Mechanizm warunkujący zmniejszenie wrażliwości na srebro jest zjawiskiem wieloczynnikowym. W procesie generowania zmniejszonej wrażliwości biorą udział zarówno struktury powierzchniowe jak i cytoplazmatyczne. W przeprowadzonych badaniach własnych skupiono się wyłącznie na białkach błony zewnętrznej. Szczegółowe poznanie mechanizmów generowania zmniejszonej wrażliwości na nanokompozyty srebra wymaga podjęcia szeroko zakrojonych badań.

PODSUMOWANIE

Występowanie bakteryjnej oporności na nanokompozyty srebra jest ściśle zależne od ich właściwości fizyko-chemicznych (rozmiaru, struktury, rodzaju nośnika, obecności nośnika, długotrwałe traktowanie szczepów *E. coli* 408, *E. coli* 555 i *E. coli* ATCC 11228 amorficznym TiO_2 domieszkowanym nanocząstkami srebra (próba B) wpłynęło na zmianę poziomu syntezy białek błony zewnętrznej, co jest wynikiem zmian w materiale genetycznym lub efektem adaptacji komórek do stresowych warunków środowiska. Analiza porównawcza wykazała różnice w profilach białkowych między szczepami dzikimi i ich wariantami (zmiany w liczbie OMPs: utrata lub synteza nowych białek). Brak zmian w profilu białkowym w/w szczepów po długotrwałej ekspozycji na nanokompozyty o innych właściwościach fizyko-chemicznych niż próba B, świadczyć może o innym sposobie ich działania na komórkę bakterii. Wyżej opisane badania dowodzą możliwości narastania oporności na nanokompozyty srebra wśród bakterii Gram-ujemnych o pewnych określonych cechach fizyko-chemicznych. Choć uzyskane wyniki stanowią zaledwie podstawę do dalszych badań, powinny one być motywacją do ograniczenia pozamedycznej, niekontrolowanej dystrybucji artykułów zawierających w swojej strukturze srebro w postaci nanometrycznej.

Badania finansowane z grantu nr 2112/M/IGM/14 na prowadzenie badań naukowych i prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich UWr.

PIŚMIENNICTWO

1. Achouak W, Heulin T, Pagès JM. Multiple facets of bacterial porins. FEMS Microbiol Lett 2001; 199: 1–7.
2. Bugla-Płoskońska G, Jasiorski M, Leszkiewicz A i inni. Bakteriobójcze działanie immobilizowanych preparatów srebra i możliwość ich praktycznego zastosowania. Farmaceutyczny Przegląd Naukowy 2008; 37: 23–6.
3. Bugla-Płoskońska G, Korzeniowska-Kowal A, Guz-Regner K. Reptiles as a source of Salmonella O48-clinically important bacteria for children: the relationship between resistance to normal cord serum and outer membrane protein patterns. Microb Ecol 2011; 61: 41–51.
4. Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. Molecular analysis of the copper-transporting

- efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003; 185: 3804–12.
5. Gromova I, Celis JE. Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass Spectrometry. W: *Cell Biology, a Laboratory Handbook*. Red. Elsevier. San Diego 2004, 219–23.
 6. Kedziora A, Korzekwa K, Stręk W i inni. Silver Nanoforms as a Therapeutic Agent for Killing *Escherichia coli* and Certain ESKAPE Pathogens. *Current Microbiology* 2016; 73: 139–47.
 7. Kędziora A, Krzyżewska E, Dudek B, Bugła-Płoskońska G. The participation of outer membrane proteins in the bacterial sensitivity to nanosilver. *Postepy Hig Med Dośw* 2016; 70: 610–17.
 8. Kędziora A, Sobik K. Oporność bakterii na srebro - problem stary czy nowy? *Kosmos* 2013; 62: 557–70.
 9. Kedziora A, Stręk W, Kępiniski L i inni. Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. *J Sol-Gel Sci Technol* 2012; 62, 79–86.
 10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–5.
 11. Lara HH, Ayala-Núñez NV, Turrent L del CI, Padilla CR. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 615–21.
 12. Lok CN, Ho CM, Chen R i inni. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J Proteome Res* 2006; 5: 916–24.
 13. Lok CN, Ho CM, Chen R i inni. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem* 2007; 12: 527–34.
 14. Mroczek-Sosnowska N, Jaworski S, Siennicka A, Gondek A. Unikalne właściwości nanocząstek srebra. *Pol Drobiar* 2013; 20: 6–8.
 15. Murphy TF, Bartos LC. Surface-exposed and antigenically conserved determinants of outer membrane proteins of *Branhamella catarrhalis*. *Infect Immun* 1989; 57: 2938–41.
 16. Ovington LG. The truth about silver. *Ostomy. Wound Manage* 2004; 50: 1–10.
 17. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 1712–20.
 18. Panáček A, Kvítek L, Prucek R i inni. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J Phys Chem B* 2006; 110: 16248–53.
 19. Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect* 2005; 60: 1–7.
 20. Sagripanti JL. Metal-based formulations with high microbicidal activity. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 3157–62.
 21. Silhavy TJ, Hahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; doi: 10.1101/cshperspect.a000414
 22. Thiel J, Pakstis L, Buzby S i inni. Antibacterial properties of silver-doped titania. *Small Weinhe Bergstr Ger* 2007; 3: 799–803.

Otrzymano: 20 VII 2017 r.

Adres Autora: 51-148 Wrocław, ul. S. Przybyszewskiego 63, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski,

Grzybica paznokci i skóry – analiza i omówienie wyników badań
przeprowadzonych w Pracowni Mikrobiologii Laboratorium Przygoda
grupa ALAB w Płocku w latach 2012 – 2016

Toe and skin fungus - analysis and discussion of the results of research
conducted in the Laboratory of Microbiology Laboratory Przygoda ALAB
Group in Płock in the years 2012 - 2016

Przemysław Dziewirz, Monika Lemańska

Laboratorium Przygoda grupa ALAB Sp.z.o.o Płock

Celem pracy była analiza wyników mykologicznych posiewów wykonanych w Pracowni Mikrobiologii Laboratorium Przygoda w Płocku w latach 2012-2016. Badając próbki materiału pobrane od 3733 pacjentów uzyskano 59,1% wyników dodatnich. Zmiany grzybicze najczęściej obejmowały paznokcie stóp (64,0%), zaś najrzadziej skórę pachwin (0,6%). Dominującym etiologicznym czynnikiem grzybic były dermatofity, wśród których najczęściej izolowanym gatunkiem był *Trichophyton rubrum*, stanowiący 49,5% wszystkich dodatnich hodowli.

Słowa kluczowe: grzybica paznokci, grzybica skóry, dermatofity, grzyby drożdżopodobne, pleśnie

ABSTRACT

Introduction: The aim of the study was to analyze the results of mycological cultures obtained in the Laboratory of Microbiology of Przygoda Laboratory in Płock in the years 2012-2016. The study included an analysis of the incidence of mycosis with regard to their location, as well as the proportion of individual etiologic factors in the infection.

Methods: The study included materials from 3733 patients who gave a total of 3888 scraps: fingernails of feet, fingernails of hand, foot skin, groin skin and smooth skin. The material was taken directly from the material and mycological cultures were established.

Results: Positive results accounted for 59.1%. *Trichophyton rubrum* (49.5%) was the most common etiologic agent of dermatophytes. Among the yeast-like fungi, *Candida albicans* (9.9%) were the most common.

Conclusions: The results showed that fungal infections are more common in women than in men. The most common form of mycosis is foot mycosis, and the smallest of mycobacteria is found. The most commonly cultivated mushrooms were dermatophytes and accounted for 80.0% of all positive cultures. The least frequently isolated etiologic agent was mold fungi, which accounted for only 1.3% of all positive results.

Key words: fungal nail infections, mycosis, dermatophytes, yeast-like fungus, molds.

WSTĘP

Grzybica jest najczęstszym dermatologicznym schorzeniem skóry oraz jej przydatków. Ma również wpływ na stan psychofizyczny pacjenta. Choroba ta może dotyczyć nawet 40% populacji (17).

Na występowanie i szerzenie się grzybic ma wpływ wiele czynników, m. in.:

- zaburzenie mechanizmów obronnych związanych z upośledzeniem odporności, występujący u chorych na AIDS, w przebiegu nowotworów krwi i innych chorób nowotworowych,
- warunki środowiskowe, np.: duża wilgotność, zła higiena i pielęgnacja skóry, niedożywienie, korzystanie z basenów, używanie syntetycznego obuwia i odzieży,
- inne czynniki sprzyjające zakażeniom grzybiczym to: podeszły wiek, zaburzenia krążenia, leczenie kortykosteroidami, cukrzyca i inne (2,9,18).

W przypadku chorych na AIDS zmiany grzybicze występują nawet u 50% pacjentów, natomiast cukrzycy są prawie 3-krotnie bardziej narażeni na występowanie grzybicy paznokci niż osoby zdrowe. Najczęstszą postacią grzybicy jest grzybica przydatków skóry, która częściej dotyczy paznokci stóp niż dłoni. Ma to związek z ich słabszym ukrwieniem, wolniejszym wzrostem oraz częstym przebywaniem w zaciemnionym i wilgotnym środowisku. Zakażeniu paznokci stóp może towarzyszyć grzybica skóry stóp, która w populacji polskiej występuje u co drugiego pacjenta (2,8,15).

Wśród etiologicznych czynników wywołujących grzybice możemy wyróżnić: dermatofity (*Trichophyton sp.*, *Epidermophyton sp.*, *Microsporum sp.*), grzyby drożdżopodobne (*Candida sp.*, *Malassezia sp.*, *Geotrichum*, *Trichosporon sp.*) oraz pleśnie (*Scopulariopsis sp.*, *Fusarium sp.*). Szacuje się, że najczęściej występują zakażenia dermatofitami antropofilnymi, w tym w 45% o etiologii *Trichophyton rubrum*. Zakażenia o etiologii *Candida sp.* dotyczą najczęściej paznokci rąk. Natomiast udział pleśni w grzybicach szacuje się zaledwie na 2-5% wszystkich zakażeń grzybiczych (1,12,13).

Celem badań była analiza częstości występowania zakażeń grzybiczych oraz ich etiologicznych czynników u pacjentów badanych w Pracowni Mikrobiologii Laboratorium Przygoda w Płocku w latach 2012-2016.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano wyniki mykologicznych posiewów obejmujących zeszkrobiny paznokci rąk i stóp, skóry stóp, skóry pachwin oraz skóry gładkiej. Pacjenci kierowani byli

przez lekarzy Dermatologów z Płocka, Sierpca, Gostynina oraz Żuromina. Badaniem zostały objęte również osoby zgłaszające się bezpośrednio do Pracowni Mikrobiologii, bez rozpoznania grzybicy przez lekarza. Przed pobraniem materiału klinicznego z pacjentem przeprowadzano wywiad. W przypadku, gdy bezpośrednio przed zgłoszeniem się pacjentów do laboratorium byli oni w trakcie leczenia, pobranie materiału zostawało odroczone w czasie w zależności od stosowanego leku (maści, kremy 14 dni, leki doustne od 3 do 4 tygodni). Jałowym skalpelem pobierano zeszkrobiny, z których następnie wykonywano bezpośredni preparat mikroskopowy z użyciem 20% roztworu KOH z dodatkiem 40% dwumetylosulfotlenku (DMSO). Wykonanie preparatu miało na celu orientacyjną ocenę, czy w danej próbce materiału klinicznego znajdują się elementy grzybów. Jednocześnie z wykonaniem preparatu, zakładano hodowlę na podłożu dwusekcyjnym Sabourad Dextrose Agar z chloramfenikolem oraz Sabourad Dextrose Agar z aktidionem. Hodowle w kierunku wykrycia dermatofitów prowadzono średnio przez 3 - 4 tygodnie, w kierunku pleśni do 14 dni, a w przypadku grzybów drożdżopodobnych co najmniej 5 dni. W celu zidentyfikowania dermatofitów oraz grzybów pleśniowych oceniano ich makro i mikroskopowe cechy, m.in. wygląd makrokonidiów i mikrokonidiów oraz owocników grzybni, natomiast w przypadku grzybów drożdżopodobnych do identyfikacji stosowano podłoża chromogenne, np. CHROMagar Candida oraz komercyjne testy biochemiczne np. VITEK 2 YST.

WYNIKI

Materiał do badań mykologicznych uzyskano od 3733 pacjentów. W 2206 przypadkach (59,1%) uzyskano wyniki dodatnie. Grzybicę skóry oraz jej przydatków częściej stwierdzono u kobiet niż u mężczyzn, odpowiednio 64,7% oraz 35,3%. W 1458 (64%) przypadkach potwierdzono grzybicę paznokci stóp, a w 325 (14,2%) grzybicę paznokci rąk. Grzybicę skóry gładkiej i skóry stóp stwierdzono odpowiednio w 322 i 163 przypadkach, co stanowiło 14,1% i 7,1% wyników dodatnich. U 14 (0,6%) pacjentów udało się potwierdzić grzybicę pachwin. Z 3888 założonych hodowli wyizolowano 2282 szczepów. Najczęściej hodowano dermatofity, które były odpowiedzialne za ponad 80% zakażeń. Grzyby drożdżopodobne stanowiły 17%, a pleśniowe 1,3% dodatnich hodowli.

Tabela 1. Wyniki badań prowadzonych w kierunku dermatofitów w poszczególnych latach.

Rok	Liczba wykonanych badań	Liczba wyników dodatnich	Liczba (odsetek) kobiet z wynikiem dodatnim	Liczba (odsetek) mężczyzn z wynikiem dodatnim
2012	482	392	280 (71,4%)	112 (28,6%)
2013	693	465	290 (62,4%)	175 (37,6%)
2014	820	554	371 (67,0%)	183 (33,0%)
2015	940	404	254 (62,9%)	150 (37,1%)
2016	953	391	233 (59,6%)	158 (40,4%)
RAZEM	3888	2206	1428 (64,7%)	778 (35,3%)

Tabela 2. Etiologiczne czynniki zakażeń grzybiczych z uwzględnieniem lokalizacji zmian.

Czynnik etiologiczny	Paznokcie stóp	Paznokcie dłoni	Skóra stóp	Skóra gładka	Pachwiny	RAZEM
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	400 (17,5%)	57 (2,5%)	0 (0,0%)	144 (6,3%)	0 (0,0%)	601 (26,3%)
<i>Trichophyton rubrum</i>	990 (43,4%)	0 (0,0%)	140 (6,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1130 (49,5%)
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (0,3%)	0 (0,0%)	7 (0,3%)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	13 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	16 (0,7%)	0 (0,0%)	29 (1,3%)
<i>Trichophyton verrucosum</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	17 (0,7%)	1 (0,1%)	18 (0,8%)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	23 (1,0%)	0 (0,0%)	4 (0,2%)	27 (1,2%)
<i>Microsporum canis</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	33 (1,4%)	0 (0,0%)	33 (1,4%)
<i>Microsporum gypseum</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (0,3%)	0 (0,0%)	6 (0,3%)
<i>Microsporum audouinii</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (0,4%)	0 (0,0%)	10 (0,4%)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	21 (0,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	21 (0,9%)
<i>Scopulariopsis flava</i>	2 (0,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (0,1%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5 (0,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	6 (0,3%)
<i>Trichosporon spp.</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (0,1%)	3 (0,1%)
<i>Candida albicans</i>	27 (1,2%)	140 (6,1%)	0 (0,0%)	54 (2,4%)	5 (0,2%)	226 (9,9%)
<i>Candida krusei</i>	0 (0,0%)	28 (1,2%)	0 (0,0%)	5 (0,2%)	0 (0,0%)	33 (1,4%)
<i>Candida tropicalis</i>	0 (0,0%)	14 (0,6%)	0 (0,0%)	3 (0,1%)	1 (0,1%)	18 (0,8%)
<i>Candida glabrata</i>	0 (0,0%)	19 (0,8%)	0 (0,0%)	4 (0,2%)	0 (0,0%)	23 (1,0%)
<i>Candida lipolytica</i>	0 (0,0%)	4 (0,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (0,2%)
<i>Candida kefyr</i>	0 (0,0%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	2 (0,1%)
<i>Candida lusitanae</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (0,2%)	0 (0,0%)	4 (0,2%)
<i>Candida parapsylosis</i>	0 (0,0%)	47 (2,0%)	0 (0,0%)	13 (0,6%)	0 (0,0%)	60 (2,6%)
<i>Candida famata</i>	0 (0,0%)	5 (0,2%)	0 (0,0%)	2 (0,1%)	0 (0,0%)	7 (0,3%)
<i>Candida dubliniensis</i>	0 (0,0%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	2 (0,1%)
<i>Candida zeylanoides</i>	0 (0,0%)	6(0,3%)	0 (0,0%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)	7 (0,3%)
<i>Candida rugosa</i>	0 (0,0%)	3(0,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (0,1%)
ŁĄCZNIE						2282 (100%)

Wśród dermatofitów dominowały dwa gatunki: *Trichophyton rubrum*, rozpoznany w 1130 przypadkach (49,5%) i *Trichophyton mentagrophytes* wyizolowany od 601 (26,3%) pacjentów. Obydwa gatunki najczęściej izolowano z paznokci stóp (990 przypadków; 43,4 %) oraz skóry stóp i skóry gładkiej (284; 12,5%). U 49 (2,1%) pacjentów stwierdzono zajęcie skóry gładkiej przez *Microsporum sp.*, w tym w 33 przypadkach przez *M. canis* (1,4%). Zakażenia o etiologii *Microsporum sp.* zazwyczaj dotyczyły dzieci. Inne dermatofity hodowane z zakażeń skóry to: *Epidermophyton floccosum* (27; 1,2%), *Trichophyton verrucosum* (18; 0,8%) oraz *Trichophyton tonsurans* (16; 0,7%).

Zakażenia grzybami drożdżopodobnymi dotyczyły przede wszystkim paznokci dłoni i skóry gładkiej, odpowiednio 268 (11,7%) i 88 (3,9%) przypadków. Najczęściej izolowano dwa gatunki grzybów drożdżopodobnych: *Candida albicans* (226 przypadków; 9,9%) oraz *Candida parapsilosis* (60; 2,6%). Grzyby pleśniowe wyhodowano od 29 osób, co stanowiło 1,3% wszystkich zakażeń. Znakomitą większość pleśni izolowano z paznokci stóp, gdzie dominował *Scopulariopsis brevicaulis* (21; 0,9%). W 5 (0,3%) przypadkach za przyczynę zakażenia paznokci uznano rodzaj *Fusarium*.

DYSKUSJA

W badaniach własnych najczęściej występującą postacią grzybicy była grzybica paznokci stóp, która stanowiła 64% wszystkich dodatnich hodowli. Zbliżone wyniki w swoich badaniach uzyskali Banaszek i wsp. (4) oraz Anders i wsp. (3), którzy wykazali zakażenia paznokci stóp odpowiednio u 66,5% i 61,2% badanych osób. Niższy odsetek wyników dodatnich uzyskali Matuszewicz i wsp. (14) oraz Jaworek i wsp. (10).

Na podstawie przeprowadzonych badań można wykazać różnicę w składzie mikrobioty grzybiczej izolowanej z różnych lokalizacji, tj.: skóry stóp, pachwin, skóry gładkiej oraz paznokci stóp i dłoni. W badaniach własnych, w przypadku skóry stóp oraz skóry gładkiej, najczęściej hodowane były dermatofity (odpowiednio 100% i 72,4%). Odmienne wyniki uzyskali Jaworek i wsp. (10), którzy w przypadku badania skóry stóp hodowali dermatofity w 48,8%, zaś w przypadku grzybicy skóry gładkiej głównie grzyby drożdżopodobne (65,5%). Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że w zakażeniach skóry pachwin dominowały grzyby drożdżopodobne. Pokrywa się to z wynikami badań przeprowadzonymi przez Jaworka i wsp. (10), w których odsetek wyhodowanych grzybów drożdżopodobnych wyniósł ok. 64%.

W przypadku paznokci stóp największą rolę odgrywały dermatofity, odpowiedzialne za 96,2% zakażeń. Badania przeprowadzone przez innych autorów wykazały, że w tej postaci grzybicy dermatofity izolowano odpowiednio w 53,5% i 48,5% przypadków (4, 10). W przypadku grzybicy paznokci dłoni największy udział w zakażeniach odgrywały grzyby drożdżopodobne, odpowiedzialne za 82,5% przypadków. Zbliżony odsetek wyników dodatnich (81,5%) uzyskali w swoich badaniach Banaszek i wsp. (4) nieco niższy zaś (75,2%) Jaworek i wsp. (10).

Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że najczęściej izolowanym dermatofitem był *Trichophyton rubrum*, który izolowano w 49,5% zakażeń. Gatunek ten był również najczęściej izolowanym dermatofitem w badaniach przeprowadzonych przez innych autorów, u osób zamieszkałych w Krakowie (86,2%) oraz w rejonie Bydgoszczy (53%), a także w innych krajach, m.in. w: Meksyku, Szwajcarii, USA i Szwecji (4,5,7,10,11,14,16). Z ko-

lei, w badaniach przeprowadzonych przez *Banaszak* i wsp. (4) oraz *Matuszewicz* i wsp. (14) najczęściej izolowanym dermatofitem był *Trichophyton mentagrophytes* (odpowiednio 29,5% i 90,7%). W badaniach własnych *T. mentagrophytes* był drugim co do częstości izolowanym gatunkiem grzybów (26,3%).

Zgodnie z uzyskanymi wynikami, grzyby pleśniowe były odpowiedzialne za 1,3% zakażeń. Najczęściej występującym grzybem pleśniowym był *Scopulariopsis brevicaulis*, izolowany w 21 przypadkach zeskrobin z paznokci, co stanowiło 0,9% wszystkich dodatknych hodowli. W badaniach przeprowadzonych przez *Banaszak* i wsp. (4) wykazano, że pleśnie odpowiedzialne są za 11,5% przypadków wszystkich grzybic. Z kolei, w badaniach *Andersa* i wsp. (3) odsetek ten, w przypadku zeskrobin z paznokci stóp, wynosił aż 38,5%, jednakże liczba wykonanych badań była znacznie wyższa w niż w badaniach własnych, co mogło mieć wpływ na tak znaczną różnicę uzyskanych wyników.

Pozostałe gatunki grzybów pleśniowych, zarówno w badaniach własnych jak i innych autorów, miały dość znikomy udział w wywoływaniu grzybic u ludzi. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że grzyby z rodzaju *Fusarium* odpowiedzialne były za 0,3% wszystkich zakażeń. Wyższy odsetek wyników dodatnich uzyskali *Banaszak* i wsp. (4), a wśród wyhodowanych grzybów pleśniowych znalazły się dwa gatunki: *Scopulariopsis brevicaulis* oraz *Acremonium spp.*, izolowane odpowiednio w 2 (1,1%) oraz 4 (4,4%) przypadkach.

W przeprowadzonych przez nas badaniach grzyby izolowano ogółem z 59,1% wszystkich próbek. Nieco wyższy odsetek wyników dodatnich (66,9%), uzyskała *Kaczmarek* i wsp. (11) zaś niższy (42,7%) *Jaworek* i wsp. (10). Najczęściej w badaniach własnych rozpoznawana była grzybica paznokci stóp, następnie paznokci dłoni, skóry gładkiej, skóry stóp. Wyniki te pokrywają się z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że zakażenia grzybicze częściej występują u kobiet 64,7%. Nieco niższy (56,6%) odsetek zakażeń grzybiczych u kobiet wykazali w swoich badaniach *Jaworek* i wsp. (10).

PODSUMOWANIE

1. Hodowle dodatnie stanowiły 59,1% wszystkich posiewów.
2. Zakażenia grzybicze częściej wykrywano u kobiet niż u mężczyzn.
3. W analizowanym materiale najczęściej rozpoznawano grzybicę paznokci stóp (64,0%), następnie w kolejności grzybicę: paznokci dłoni, skóry gładkiej, skóry stóp, pachwin.
4. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym grzybic były dermatofity, wśród których dominował *Trichophyton rubrum* (49,5%).
5. Diagnostyka mykologiczna ma kluczowe znaczenie w diagnostyce oraz leczeniu grzybic skóry oraz paznokci.

PIŚMIENNICTWO

1. *Adamski Z, Deja M.* Profilaktyka grzybic skóry. Zakażenia 2006, 5: 65-8.
2. *Adamski Z.* Grzybice u zakażonych wirusem HIV i AIDS. Post Dermatol. 1992, 9: 609-15.

3. Anders M. Jaworek A. Stec-Polak M. Radzimowska A. Wojas-Pelc A. Infekcje skóry i jej przydatków - analiza wyników badań mykologicznych Pracowni Mykologicznej w latach 2010-2014. *Przegląd Lekarski* 2015, 72: 253-6.
4. Banaszak A. Kurek L. Adamski Z.: Czynniki etiologiczne grzybicy paznokci w materiale Pracowni Mikologii Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu i Zakładu Mikologii Lekarskiej i Dermatologii w Poznaniu w latach 2006-2007. *Nowiny Lekarskie* 2008, 77, 5: 353-6.
5. Bonifaz A. Vázquez-González D. Saúl A.: et, al. Refractory onychomycosis due do *Trichophyton rubrum*: combination therapy with itraconazole and terbinafine. *N Dermatol Online* 2011, 2: 108-12.
6. Drakensjö IT. Chyssanthou E. Epidemiology dermatophyte infection in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. *Med Mycol.* 2011, 49: 484-8.
7. Effendy I. Lecha M. Feuihade de Chauvin M. et al. Epidemiology and clinical classification of onychomycosos. *J. Eur. Acad. Dermatol Venerol.* 2005, 19, 1: 8-12.
8. Haj R. Jak często w Europie występuje grzybica stóp. *Przegl Mikol.* 2000, 4, 6.
9. Jakubowicz K. Profilaktyka zakażeń grzybiczych stóp. *Przegl Mikol.* 2000, 4, 1/2: 18-19.
10. Jaworek A. Wojas-Pelc A. Piotrowicz-Wójcik K. Iwulska K. Sitko D. Grzybice powierzchniowe- analiza wyników badań Pracowni Mikrobiologicznej Poradni Przyklinicznej Kliniki Dermatologii w Krakowie w latach 2001-2005. *Prob Hig Epidemiol.* 2006, 87, 3: 182-6.
11. Kaczmarek D. Brzeziński P. Infekcje grzybicze paznokci w rejonie Bydgoszczy w latach 2008-2010. *Mikologia Lekarska* 2012, 19, 1: 41-4.
12. Krzyściak P. Talaga K. Pleśnice paznokci. *Zakażenia* 2015, 1: 2-10.
13. Maleszka R. Adamski Z. Szepietowski J. Baran E. Leczenie powierzchniowych zakażeń grzybiczych – rekomendacje ekspertów Sekcji Mikologicznej Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. *Przegl Dermatol.* 2015, 102: 305-15
14. Matuszewicz K. Podsiadlo B. Zwolska Z. Augustynowicz-Kopeć E.: Zakażenia grzybicze skóry w materiałach od chorych diagnozowanych w Zakładzie Mikrobiologii w latach 2000-2010. *Postęp Nauk Medycznych* 2011, 10: 887-94.
15. Mayser P. Freund V. Budihardja D. Toenail onychomycosis in diabetic patients issues and management. *Am J Clin Dermatol.* 2009, 10, 4: 211-20.
16. Monod M. Jaccoud S. Zaugg C. Léchenne B. Survey of Dermatophyte Infection in the Lausanne Area (Switzerland). *Dermatology* 2002, 205: 201-3.
17. Reich A. Szepietowski J. Jakość życia w grzybicach powierzchniowych. *Mikologia-co nowego?*. Cornetis Wrocław 2008, 256-63.
18. Szepietowski J. Grzybice skóry i paznokci. *Vademecum lekarza praktyka. Med Prakt.* Kraków 2001.

Szczepienia przeciw pneumokokom

Vaccination against pneumococcal disease

Klaudia Brodzik, Paulina Górską, Katarzyna Woźnica, Małgorzata Głowska,
Karol Wdowiak, Aleksandra Anna Zasada

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego –
Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa

Streptococcus pneumoniae to bakterie występujące w jamie nosowo-gardłowej dzieci i dorosłych, będące etiologicznym czynnikiem wielu zakażeń inwazyjnych oraz nieinwazyjnych. Ze względu na to, iż zakażenie pneumokokami może doprowadzić do wielu powikłań i śmierci wśród dzieci do 2 roku życia oraz osób starszych po 65 roku życia, wiele państw zdecydowało się na wprowadzenie powszechnych szczepień przeciw *S. pneumoniae*. W pracy przedstawiono dostępne na rynku szczepionki oraz efekty ich stosowania, a także informacje o prowadzonych badaniach w kierunku opracowania nowych szczepionek przeciw pneumokokom.

Słowa kluczowe: *Streptococcus pneumoniae*, zakażenie, szczepienia, PCV7, PCV13, PPSV23

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a bacterium colonizing the nasopharynx of children and adults, and is an etiologic agent of many invasive and non-invasive infections. Due to the fact that pneumococcal infection can cause many complications and a significant mortality rate in children under 2 years and elderly people over 65, many countries have decided to introduce compulsory vaccination against *S. pneumoniae* infections. In the paper, pneumococcal vaccines available on the market have been described as well as results of vaccination. Moreover, studies toward development of new pneumococcal vaccines have been presented.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, infection, vaccination, PCV7, PCV13, PPSV23

WSTĘP

Streptococcus pneumoniae, zwany pneumokokiem, jest Gram-dodatnią, tlenową bakterią, która może bezobjawowo kolonizować jamę nosowo-gardłową dzieci (nosicielstwo stwierdzono u prawie 60% dzieci uczęszczających do żłobka lub przedszkola) i dorosłych (kilkadziesiąt procent) (12). Bakterie przenoszone są drogą kropelkową (kaszel, kichanie), bądź przez kontakt bezpośredni (21). Do tej pory zidentyfikowano ponad 90 serotypów, różniących się właściwościami antygenowymi polisacharydowej otoczki bakteryjnej, przy czym 10 z nich odpowiada za 62% zakażeń (24). Oprócz otoczki polisacharydowej, która jest głównym czynnikiem wirulencji *S. pneumoniae*, znanych jest wiele innych czynników ułatwiających proces kolonizacji i prowadzących do rozwoju chorób pneumokokowych tj. pneumolizyna (Ply), autolizyna (LytA), antygen powierzchniowy A (PspA), lipoproteina wychwytyująca żelazo (PiaA) oraz neuraminidaza NanA (Tabela 1) (23).

Tabela I. Czynniki wirulencji *S. pneumoniae* (23)

Czynnik wirulencji	Funkcja
Pneumolizyna (Ply)	Toksyna cytolityczna, która działa jako ligand receptora typu Toll, aktywuje szlak dopełniający i stymuluje różne cytokiny zapalne.
Autolizyna (LytA)	Trawi ścianę komórkową bakterii, uwalniając pneumolizynę oraz treść komórkową.
Antygen powierzchniowy A (PspA)	Bierze udział w wychwytywaniu jonów metali, czego skutkiem jest ochrona przed stresem oksydacyjnym.
Lipoproteina wychwytyująca żelazo (PiaA)	Wchodzi w skład systemu transportu kasetowego, wiążącego ATP i odpowiada za pozyskiwanie żelaza do wzrostu bakterii.
Neuraminidaza (NanA)	Rozkłada kwas sialowy, który bierze udział w adhezji i kolonizacji, ponadto deglikozyluje składniki dopełniacza w celu uniknięcia szlaku dopełniacza gospodarza.

Zakażenia pneumokokami są najczęstszą przyczyną zapalenia płuc, ale powodują także m. in. zapalenie ucha środkowego, zapalenie gardła, zapalenie zatok, zapalenie opon mózgowych i bakteriemie (1, 3, 5). W krajach wysoko rozwiniętych zakażenia *S. pneumoniae* są odpowiedzialne za około 30% wszystkich przypadków zapalenia płuc u dorosłych, a śmiertelność wynosi od 11% do 40% (5). Na zakażenia najbardziej narażone są osoby chore na cukrzycę, astmę, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, choroby układu krążenia, anemię sierpowatą oraz osoby z niską odpornością immunologiczną (5). Pneumokoki są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i wysokiej śmiertelności wśród dzieci do 2 roku życia, które mają niedostatecznie ukształtowany układ immunologiczny oraz dorosłych powyżej 65 roku życia (2, 21, 36). Najcięższą postacią zakażenia *S. pneumoniae* jest Inwazyjna Choroba Pneumokokowa (ICHP), która przebiega w postaci zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, posocznicy, ropnego zapalenia płuc i bakteriemii (14). ICHP może doprowadzić do wielu powikłań, tj. niedosłuchu, zmian w sercu czy płucach, głębokiego upośledzenia, ale też w wyniku niewydolności wielonarządowej do śmierci (14).

S. pneumoniae rozwinęły oporność na antybiotyki β -laktamowe, takie jak penicylina i jej pochodne, makrolidy (np. erytromycyna) oraz cefalosporyny III generacji. Zakażenia antybiotykoopornymi serotypami są bardzo trudne do wyleczenia, co wpływa na dużą

śmiertelność, a także na zwiększone koszty opieki zdrowotnej. Według raportu Ośrodka Kontroli i Zapobiegania Chorobom (CDC) z 2013 r., antybiotykooporne *S. pneumoniae* były przyczyną 19 000 hospitalizacji, 7000 zgonów, a roczne koszty opieki medycznej wzrosły o 96 milionów dolarów (9). Analizy przeprowadzone w latach 2009-2013 w USA wykazały, że po szczepieniach PCV13, w wielu grupach wiekowych zmniejszyła się liczba zakażeń niektórymi serotypami antybiotykoopornymi, np. z 8,3 na 6,0 przypadków na 100 000 wśród dzieci w wieku poniżej 5 lat i z 12,2 na 9,0 przypadków na 100 000 wśród dorosłych w wieku powyżej 65 lat, co dowiodło, że szczepionki przeciw pneumokokom są ważnymi narzędziami w walce z bakteriami opornymi na antybiotyki (31).

DOŚTĘPNE NA RYNKU SZCZEPIONKI PRZECIW PNEUMOKOKOM

Dostępne są obecnie dwa rodzaje szczepionek, mających na celu ochronę przed zakażeniem pneumokokowym: szczepionki polisacharydowe oraz szczepionki skoniugowane (11). Pierwsze szczepionki polisacharydowe opracowano w 1977 roku. W ich składzie znalazły się polisacharydy otoczkowe 14 różnych serotypów bakterii *S. pneumoniae*, zastosowane jako silnie immunizujące antygeny (33). Mechanizm działania procesu odpornościowego, wywołanego antygenem szczepionki polisacharydowej, zachodzi w szpikozależnych komórkach limfatycznych typu B, niezależnie od grasiczo-zależnych limfocytów T. Jest to przyczyną niskiej skuteczności szczepień wykonanych tym rodzajem szczepionki u niemowląt poniżej 2 roku życia, ponieważ ich układ odpornościowy nie jest jeszcze odpowiednio rozwinięty (20). W 1983 roku zarejestrowano nową, 23-walentną, polisacharydową szczepionkę przeciwko pneumokokom (PPSV23). W jej składzie znalazły się aż 23 różne serotypy tych bakterii, mające charakter groźnych dla zdrowia patogenów: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F oraz 33F (11, 27). Poprzez zastosowanie tak przygotowanej szczepionki udało się zapewnić ochronę przed 80-90% chorobotwórczych serotypów *S. pneumoniae*. Schemat szczepienia PPSV23 obejmuje podanie dwóch dawek preparatu: dawki podstawowej oraz dawki przypominającej po upływie 3 lat. Na podstawie wieloletnich obserwacji ustalono, że taki schemat szczepienia zapewnia długotrwałą ochronę przed zakażeniem. Dzięki wprowadzeniu szczepionki PPSV23 zredukowano odsetek ciężkich chorób oraz powikłań wywołanych przez pneumokoki wśród osób z grup podwyższonego ryzyka, narażonych na zakażenie tj. dzieci w wieku powyżej 2 lat, osób przewlekle chorych oraz starszych (17, 28).

W celu stworzenia preparatu mogącego wywołać odpowiedź immunologiczną u niemowląt poniżej 2 roku życia, skoncentrowano się na opracowaniu antygeny posiadającego w swojej strukturze białko. Polisacharydy otoczkowe wywołujące odpowiedź immunologiczną skoniugowano z białkiem nośnikowym. Jako nośnik zastosowano zmutowaną toksynę błoniczą. Na przełomie XX i XXI wieku wprowadzono na rynek pierwszą szczepionkę ze skoniugowanym antygenem, zawierającą w swoim składzie polisacharydy 7 różnych serotypów *S. pneumoniae* (PCV7), wcześniej zastosowane w szczepionce PPSV23: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F oraz 23F (8). Zastosowanie skoniugowanego antygeny pozwoliło na indukcję pożądaną produkcję przeciwciał zależnych od limfocytów T. Dzięki temu osiągnięto odpowiednią odpowiedź immunologiczną u najmłodszych dzieci, jak również zwiększono siłę odpowiedzi immunologicznej wśród osób starszych, u których PPSV23 nie wywołała procesu immunizacji (11). Wprowadzenie nowej szczepionki przyczyniło się do znacznego obniżenia zachorowalności wśród osób zaszczepionych, jak również osób z ich otoczenia. Niestety po upływie zaledwie 5

lat od momentu wprowadzenia PCV7 zaobserwowano znaczny wzrost występowania chorób wywołanych przez kolejne serotypy *S. pneumoniae*, niewystępujące w składzie szczepionki PCV7, a obecnie dotychczas w szczepionce 23-walentnej (11, 29). W następstwie tego, w 2010 roku udoskonalono dotychczasową szczepionkę skoniugowaną PCV7 poprzez dodanie 5 dodatkowych antygenów, zastosowanych w PPSV23 oraz jednego nowego, dotychczas niewykorzystanego w żadnym dostępnym produkcie. W skład PCV13 wchodzi antygeny wyizolowane z serotypów: 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F oraz 6A, dotychczas niestosowany (8).

W międzyczasie na rynku pojawiła się również szczepionka 10-walentna. PCV10 w swoim składzie posiada skoniugowane z białkiem nośnikowym antygeny polisacharydów otoczkowych 10 różnych serotypów *S. pneumoniae*. Producent w składzie swojego produktu nie ujął 3 typów serologicznych: 3, 6A, 19A, zawartych w PCV13 (30). Według Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN) serotyp 19A jest jednym z najczęściej wywołujących IChP w Polsce (37). Pomimo różnic w składzie jakościowym obu preparatów skoniugowanych, badania nie wykazały istotnych różnic w skuteczności ochrony przed chorobami wywoływanymi przez *S. pneumoniae*. Szczepionka 10-walentna jest obecnie obowiązującym preparatem podczas realizacji kalendarza szczepień obowiązkowych w Polsce (26).

Preparaty obecnie dostępne na rynku zawierają w swoim składzie antygeny polisacharydowe skoniugowane z białkiem D, pochodzącym ze szczepów *Haemophilus influenzae*, toksoidem tężcowym oraz toksoidem błoniczym. Zastosowane antygeny adsorbuje się na adiuwantach glinowych takich jak wodorotlenek glinu czy fosforan glinu (26).

Ze względu na znaczną różnorodność polisacharydów otoczkowych u *S. pneumoniae*, trwają badania nad stworzeniem bardziej konserwatywnego antygenu opartego wyłącznie na strukturze białkowej (4, 11). Pośród potencjalnych białek, które cieszą się zainteresowaniem badaczy, wymienić należy pneumokokowe białko powierzchniowe A (PspA) oraz genetycznie oczyszczoną pochodną pneumolizyny (PdB) (7). Badania wykazują obecność PspA we wszystkich izolatach klinicznych. Udało się wykazać, że rekombinowane postacie tych białek zastosowane do immunizacji, wywołały znaczącą ochronę przed zakażeniem pneumokokowym na modelu mysim (6). Kolejnym przykładem, który należy wymienić jako przyszłość szczepionek przeciwko *S. pneumoniae* jest *Pneumococcal pilus 1*, czyli grupa złożona z trzech różnych białek związanych z wirulencją tych bakterii. Rekombinowane białka, stworzone poprzez fuzję wspomnianych trzech podjednostek białkowych, wywołały produkcję przeciwciał na modelu mysim, jednocześnie chroniąc organizm przed inwazją serotypów pneumokokowych posiadających pili (19).

Nowe podejście do szczepionek przeciwko pneumokokom, mające na celu stworzenie preparatu z białkowymi antygenami, może wkrótce doprowadzić do pojawienia się na rynku szczepionki, która będzie wykazywała znacznie lepszą odpowiedź immunologiczną, a co za tym idzie skuteczniejszą ochronę dzieci, osób starszych i chorych.

KALENDARZ SZCZEPIEŃ A SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIONKI

W Europie stosowanie szczepionek przeciw pneumokokom przyczyniło się znacząco do zredukowania liczby przypadków IChP, powodowanej przez *S. pneumoniae* o serotypach obecnych w szczepionkach, wśród dzieci poniżej 2 r.ż., a także u dzieci nieszczepionych i dorosłych (tzw. odporność zbiorowiskowa) (11, 33). Szczepionki te okazały się również skuteczne przeciw innym chorobom wywoływanym przez pneumokoki, tj. zapalenie

płuc, ropniak i ostre zapalenie ucha środkowego. Skuteczność szczepienia jest największa w krajach o najwyższym wyszczepieniu, tj. Stany Zjednoczone i Wielka Brytania. Dla skutecznej ochrony przed zakażeniem pneumokokami istotne jest również ściśle przestrzeganie terminów wskazanych w kalendarzu szczepień ochronnych (16, 33).

W 2012 roku wytwórcy PCV13 i PCV7 zorganizowali w Hiszpanii międzynarodowy panel ekspercki, mający na celu ocenę skuteczności szczepionek przeciw pneumokokom, poziomu wyszczepialności oraz przestrzegania terminów szczepień. Uczestniczyli w nim lekarze klinicyści i mikrobiolodzy z Belgii, Niemiec, Grecji, Włoch, Portugalii, Hiszpanii i Wielkiej Brytanii. Uczestnicy dzielili się swoim doświadczeniem zawodowym oraz opublikowanymi i nieopublikowanymi danymi z poszczególnych krajów. Wytwórcy przekazali także dane dotyczące wyników badań rynku (15). Stwierdzono, że w wielu krajach istnieje problem z przestrzeganiem kalendarza szczepień ochronnych, co skutkuje zmniejszeniem skuteczności szczepionek (15).

Opóźnienia w podawaniu szczepionek przeciw pneumokokom i niedostosowanie się do terminów zalecanych w kalendarzach szczepień zdarzają się relatywnie często i wiążą się ze zbyt późnym podaniem szczepionek w schemacie szczepienia podstawowego albo z zaniechaniem bądź opóźnieniem szczepienia przypominającego. Rozmiar problemu jest różny w różnych krajach Europy, jednak ma znaczący wpływ na skuteczność szczepienia (15).

Kalendarze szczepień ochronnych w krajach europejskich różnią się pod względem rodzaju zalecanych szczepionek przeciw pneumokokom (różna liczba serotypów) oraz schematów ich podawania. Na stronie internetowej Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (European Centre for Disease Prevention and Control) opublikowano aktualnie obowiązujący kalendarz szczepień ochronnych dla wszystkich krajów Unii Europejskiej (31).

Europejskie kalendarze szczepień ochronnych zalecają podawanie szczepionek przeciw pneumokokom w schemacie 2+1 albo w schemacie 3+1. W zależności od kraju, szczepionki podawane są od 1 do 6 miesięcy, a następnie od 10 do 18 miesiąca życia. Istnieją również różnice z rodzaju zalecanych szczepionek (zawierających różną liczbę serotypów *S. pneumoniae*) (26).

Na podstawie danych klinicznych i trendów zachorowań powodowanych zakażeniem pneumokokami, trzynastowalentna szczepionka (PCV13) jest obecnie zalecana w Europie dla dzieci oraz wszystkich dorosłych w wieku powyżej 65 lat (31, 33). Uprzednio zalecano szczepienie w grupie osób starszych szczepionką PPSV23. Badania prowadzone w ostatnich latach koncentrowały się na prawidłowej sekwencji podawania szczepionek 13- i 23-walentnych (PCV13 i PPSV23) u osób starszych. Wykazały one większą lub porównywalną immunogenność PCV13 w porównaniu do PPSV23 w odniesieniu do serotypów wspólnych dla obu szczepionek (21, 22). Wykazano, że gdy tylko jest to możliwe, osobom w wieku powyżej 65 lat jako pierwszą należy podawać szczepionkę PCV13. Jeśli pacjent nie był wcześniej szczepiony, jako pierwsza powinna być podana szczepionka PCV13. PPSV23 natomiast należy podać 6 do 12 miesięcy po pierwszym szczepieniu, a jeśli jest to niemożliwe, PPSV23 można podać 8 tygodni po szczepieniu PCV13. U osób, którym podano PPSV23, szczepionkę PCV13 można podać po upływie 12 miesięcy (22, 33).

ZAKAŻENIA PNEUMOKOKOWE I SZCZEPIENIA W POLSCE

Badania przeprowadzane w Polsce pokazują bardzo niską zapadalność na IChP w porównaniu do innych krajów europejskich, które wprowadziły wzmożone monitorowanie zakażeń pneumokokowych. Należy jednak wziąć pod uwagę to, że wyniki w Polsce są

mocno niedoszacowane przede wszystkim ze względu na rzadkie wykonywanie posiewów krwi, choć nie jest to jedyny powód. Dlatego w Polsce nie powinniśmy mówić o niskiej zapadalności na IChP, tylko o bardzo niskiej wykrywalności (14).

W związku z rosnącą liczbą przypadków zakażeń pneumokokowych, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia, od stycznia 2017 roku szczepienie przeciw *S. pneumoniae* znajduje się na liście szczepień obowiązkowych (13).

W 2016 r. na terenie Polski zdiagnozowano 699 przypadków IChP (w 2010 r. – 298 przypadków, w 2013 r. – 474, a w 2015 r. – 701). Wśród serotypów, które najczęściej wywoływały IChP we wszystkich grupach wiekowych wymieniano: 3, 14, 19A. Przez ostatnie 10 lat coraz częściej izoluje się od chorych jeden z najbardziej niebezpiecznych serotypów - 19A. Szacuje się, że około 95% szczepów serotypu 19A wykazuje wielolekooporność (MDR). Również bardzo często występują zakażenia wielolekoopornym serotypem 3, wywołującym śmiertelne przypadki IChP, głównie wśród ludzi starszych po 65 r.ż. (49,3%) (37). Można zaobserwować ogromne zróżnicowanie w poszczególnych grupach wiekowych, co do występowania zakażeń wywoływanych przez określone serotypy (Tabela II).

Tabela II. Serotypy *S. pneumoniae* wywołujące zakażenia w różnych grupach wiekowych w Polsce w latach 2014-2016 (37)

Grupa wiekowa	2014 r.	2015 r.	2016 r.
Dzieci poniżej 2 r.ż.	19A, 14, 23F, 1, 4, 3, 6B, 9V, 33F, 19F, 22F, 10A, 23B, 9N, 23A, 24F, 38	6B, 14, 19A, 19F, 38, 18C, 23F, 22F, 33F	19F, 6B, 9V, 14, 19A, 10A, 15B/C, 23A, 38, 1, 18C, 23F, 3, 12F
Dzieci do 5 r.ż.	14, 19A, 19F, 3, 9V, 23F, 22F, 10A, 23B, 15A, 23A, 15B/C, 38	14, 3, 1, 6A, 19A, 8, 38, 15B/C, 6B, 9V, 19F, 10A, 12F, 23B	14, 19A, 19F, 6B, 6A, 15B/C, 1, 18C, 11A, 47F
Dorośli powyżej 65 r.ż.	3, 14, 9V, 19F, 11A, 6B, 7F, 23F, 22F, 1, 19A, 6A, 9N, 4, 23B, 15A, 35F, 10A, 8, 6C, 34, 35B, 18C, 23A, 33F, 15B/C, 20, 31, 11B	3, 14, 22F, 19A, 19F, 23F, 4, 9V, 9N, 6B, 7F, 8, 11A, 6C, 6A, 23A, 38, 1, 18C, 12F, 31, 10A, 35F, 23B, 15B/C, 15A, 20, 34, 7C, 33F, 17A	3, 14, 19A, 9V, 4, 9N, 11A, 22F, 15A, 23A, 6B, 19F, 8, 10A, 7F, 23F, 6A, 35F, 15B/C, 38, 31, 18C, 23B, 6C, 12F, 16F, 34, 24F, 33F, 1, 35B, 47F

W Polsce stosuje się dwa rodzaje szczepionek przeciw pneumokokom. Pierwszym rodzajem są szczepionki skoniugowane, do których zaliczyć można bezpłatną obecnie, dziesięciowalentną PCV10 dla dzieci od 6 tyg. do 5 r.ż. oraz płatną, trzynastowalentną PCV13 dla dzieci od 6 tyg. życia, nastolatków i dorosłych. Drugim rodzajem są szczepionki polisacharydowe PPSV23, przeznaczone dla osób starszych powyżej 65 r.ż. oraz chorych powyżej 2 lat, którzy są szczególnie narażeni na ciężkie zakażenia pneumokokowe ze względu na stan zdrowia(38).

Bezpłatne szczepienia przeciw pneumokokom przebiegają w schemacie 2+1: dwie dawki szczepienia podstawowego w 1-szym roku życia oraz dawka uzupełniająca w 2-gim roku życia. Szczepienie dzieci z grup ryzyka przebiega w schemacie 3+1: trzy dawki szczepienia podstawowego w 1-szym roku życia oraz dawka uzupełniająca w 2-gim roku życia. Schemat, według którego podawana jest szczepionka nastolatkom i dorosłym, zale-

ży od wieku osoby otrzymującej pierwszą dawkę. Należy przede wszystkim kierować się wskazaniem producenta umieszczonymi w Charakterystyce Produktu Leczniczego oraz ulotce dołączonej do opakowania danej szczepionki (38). Szczepionki PCV10 oraz PCV-13 są bezpieczne i skutecznie zapobiegają IChP wywołanej przez serotypy znajdujące się w ich składzie (również u dzieci z niedoborami odporności) (35).

Przykładem skuteczności szczepień przeciw pneumokokom w kontekście zarówno odporności indywidualnej jak i zbiorowskiej są dane dotyczące Kielc, gdzie powszechne bezpłatne szczepienia dzieci przeciw pneumokokom prowadzone są od 2006 r. Początkowo program szczepień dzieci realizowano szczepionką PCV7, a od 2010 r. szczepionką PCV 13. Dzięki tym szczepieniom liczba zachorowań na zapalenia płuc u dzieci do 2 r.ż. spadła o 80%, natomiast u osób po 65. roku życia obcuujących ze szczepionymi - o ponad 60%, co jest efektem odporności zbiorowskiej (39).

PODSUMOWANIE

Najczęstszą przyczyną bakteryjnego zapalenia płuc jest zakażenie *S. pneumoniae*. W leczeniu zapalenia płuc stosowano antybiotyki, jednak wzrosła ilość antybiotykoopornych serotypów *S. pneumoniae*. Bardzo wysoki poziom zachorowalności oraz śmiertelności spowodowanej zakażeniem *S. pneumoniae* w ciągu ostatniego ćwierćwiecza zmusza opiekę zdrowotną do skupienia się na rozwoju szczepień ochronnych, co umożliwi zahamowanie rozprzestrzenienia się choroby pneumokokowej wśród dzieci i dorosłych (5, 11). Szereg badań skoncentrowano na poznaniu i wykorzystaniu węglowodanów i białek wyizolowanych z powierzchni *S. pneumoniae* jako antygenów niezbędnych w procesie immunizacji (4). Obecnie dostępne szczepionki chronią przed chorobami wywoływanymi przez pneumokoki, również przed zakażeniem antybiotykoopornymi serotypami oraz ograniczają proces nabywania oporności bakterii na antybiotyki (32). Wiele badań wskazuje na to, iż zastosowanie szczepionki PCV wpływa na spadek ilości bakterii kolonizujących jamę nosowo-gardłową u dzieci, a co za tym idzie zmniejszenie transmisji *S. pneumoniae* od dzieci do osób dorosłych o czym świadczy zmniejszenie liczby przypadków IChP (10, 18, 25, 34). Istotne jest monitorowanie wpływu szczepień na epidemiologię zakażeń pneumokokowych oraz na zjawisko zastępowania „szczepionkowych” typów serologicznych przez typy „nieszczepionkowe” (35).

PIŚMIENICTWO

1. Bewick T, Sheppard C, Greenwood S, Slack M i inni. Serotype prevalence in adults hospitalised with pneumococcal non-invasive community-acquired pneumonia. *Thorax* 2012; 67: 540–5.
2. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE i inni. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010; 375: 1969–87.
3. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 144–54.
4. Bogaert D, Hermans PW, Adrian PV, Rümke HC, de Groot R. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* 2004; 22: 2209–20.
5. Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention. *Pharmacotherapy* 2005; 25: 1193–212.

6. Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A i inni. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. J Infect Dis 2000; 182: 1694-701.
7. Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW i inni. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 2003; 188: 339-48.
8. Bryant KA, Block SL, Baker SA, Gruber WC, Scott DA. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine PCV13 Infant Study Group. Pediatrics 2010; 125: 866-75.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2013.
10. Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 16-20.
11. Daniels CC, Rogers D, Shelton CM. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. J Pediatr Pharmacol Ther 2016; 21: 27-35.
12. Davis SM, Deloria-Knoll M, Kassa HT, O'Brien KL. Impact of pneumococcal conjugate vaccines on nasopharyngeal carriage and invasive disease among unvaccinated people: review of evidence on indirect effects. Vaccine 2014; 32: 133-45.
13. Dziennik Ustaw z 2016 r. poz. 1815 §3 pkt 4.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014-Vaccine – preventable diseases – invasive bacterial diseases. Stockholm: ECDC; 2015.
15. Gervais A, Ansaldo F, Brito-Avo A, Azzari C i inni. Pneumococcal Vaccination in Europe: Schedule Adherence. Clin Ther 2014; 36: 802-12.
16. Grabenstein JD, Klugman KP. A century of pneumococcal vaccination research in humans. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 15-24.
17. Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S i inni. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. Washington DC: Public Health Foundation; 2015.
18. Hampton LM, Farley MM, Schaffner W i inni. Prevention of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. J Infect Dis 2011; 205: 401-11.
19. Harfouche C, Filippini S, Gianfaldoni C, Ruggiero P i inni. RrgB321, a fusion protein of the three variants of the pneumococcal pilus backbone RrgB, is protective in vivo and elicits opsonic antibodies. Infect Immun 2012; 80: 451-60.
20. Heilmann C. Human B and T lymphocyte responses to vaccination with pneumococcal polysaccharides. APMIS Suppl. 1990; 15:1-23.
21. Jackson LA, Gurtman A, van Cleeff M, Jansen KU i inni. Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults. Vaccine 2013; 31: 3577-84.
22. Jackson LA, Gurtman A, Rice K, Pauksens K i inni. Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in adults 70 years of age and older previously vaccinated with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Vaccine 2013; 31: 3585-93.

23. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 288–301.
24. Kapatai G, Sheppard CL, Al-Shahib A, Litt DJ i inni. Whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*: development, evaluation and verification of targets for serogroup and serotype prediction using an automated pipeline. *PeerJ* 2016; 4: 2477.
25. Kim GL, Seon SH, Rhee DK. Pneumonia and *Streptococcus pneumoniae* vaccine. *Arch Pharm Res* 2017; 40: 885–93.
26. Pneumococcal vaccines. WHO position paper – 2012. World Health Organization; *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87: 129–44.
27. PNEUMOVAX 23. Charakterystyka produktu leczniczego.
28. Shapiro ED, Berg AT, Austrian R i inni. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1991; 325: 1453–60.
29. Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL i inni. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA* 2007; 297: 1784–92.
30. Synflorix. Charakterystyka produktu leczniczego.
31. Tomczyk S, Bennett NM, Stoecker C, Gierke R i inni. Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Among Adults Aged ≥65 Years: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *CDC Weekly* 2014; 63(37): 822–25.
32. Tomczyk S, Lynfield R, Schaffner W, Reingold A, Miller L i inni. Prevention of Antibiotic-Nonsusceptible Invasive Pneumococcal Disease With the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Clin Infect Dis* 2016; 62: 1119–25.
33. Tromp KM, Campbell MW, Vazquez A. Recent Developments and Future Directions of Pneumococcal Vaccine Recommendations. *Clin Ther* 2015; 37(5).
34. Tyrrell GJ, Lovgren M, Chui N i inni. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* pre- and post-seven valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000–2006. *Vaccine* 2009; 27: 3553–60.
35. Vergison A. Skuteczność skoniugowanych szczepionek przeciwko pneumokokom o rozszerzonym składzie antygenowym w profilaktyce inwazyjnej choroby pneumokokowej. *Med Prakt* 2013; 1: 15–7.
36. Wunderink RG, Waterer GW. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 2014; 370: 1863.
37. www.koroun.edu.pl/pdf/ICHP2016.pdf (data dostępu 05.10.2017).
38. www.szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/pneumokoki/ (data dostępu 03.10.2017).
39. „Zapobiegaj – Ochraniaj – Szczep” – Konferencja Główna Obchodów VIII Ogólnopolskiego Dnia Szczepień, Warszawa, 09.12.2016 r. (materiały konferencyjne).

Otrzymano: 13 X 2017 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Rola czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*
w nadawaniu oporności na działanie układu dopełniacza

The role of *Yersinia enterocolitica*
virulence factors in the complement resistance

Katarzyna Morka, Gabriela Bugla-Płoskońska

Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych,
Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Układ dopełniacza należący do wrodzonej odpowiedzi immunologicznej jest pierwszą linią obrony gospodarza przed czynnikami patogennymi. Enteropatogenne pałeczki *Y. enterocolitica* zdolne są do wywoływania bezobjawowej bakteriemii oraz ogólnoustrojowego zakażenia dzięki możliwości przetrwania we krwi. Prezentowana praca przedstawia usystematyzowaną wiedzę na temat czynników wirulencji, które odpowiedzialne są za oporność *Y. enterocolitica* na działanie układu dopełniacza.

Słowa kluczowe: *Yersinia enterocolitica*, oporność na dopełniacz, YadA, Ail, OmpC, LPS

ABSTRACT

The complement, an innate immune response, is the first line of host defense against pathogenic factors. *Yersinia enterocolitica* is an enteropathogenic rods capable to cause asymptomatic bacteremia and systemic infection due to its ability to survive in the the blood. This study attempts to summarize the knowledge in the field of *Y. enterocolitica* virulence factors involved in complement resistance.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, complement resistance, YadA, Ail, OmpC, LPS

WSTĘP

Y. enterocolitica to Gram-ujemne pałeczka z rodziny *Enterobacteriaceae* wywołujące odzwierzęcą chorobę zakaźną wśród ludzi i zwierząt nazywaną jersiniozą. Gatunek *Y. enterocolitica* obejmuje zarówno biotypy patogenne (1B, 2, 3, 4, 5) jak i niepatogenne (1A) względem ludzi i zwierząt. Serotypy należące do patogennych biotypów powszechnie wywołują jersiniozę to

O3; O8; O9; O5,27. Jersinioza jest trzecią pod względem liczby zachorowań zoonozą układu pokarmowego w Polsce i Europie (8). Jersinioza jelitowa wśród ludzi objawia się niespecyficznymi symptomami, takimi jak gorączka, bóle brzucha, biegunka o charakterze samoograniczającym, wymioty spowodowane nieżytem i stanem zapalnym żołądka i jelit. W związku z tropizmem pałeczek *Y. enterocolitica* do tkanki limfatycznej możliwymi objawami są również zapalenie węzłów chłonnych krezki jelitowej. Powikłania po przebytej jersiniozie dotyczą objawów takich jak rumień guzowaty podskórnej tkanki tłuszczowej, reaktywne zapalenie stawów, rumień wielopostaciowy, zapalenie tęczówki, zespół Reitera czy zapalenie kłębuszków nerkowych. Jersinioza pozajelitowa może przybierać postać bezobjawowej bakteriemii czy posocznicy wśród pacjentów z chorobami układu krwiotwórczego, z podwyższonym poziomem żelaza we krwi, cukrzycą, marskością wątroby czy innymi przewlekłymi schorzeniami bądź wśród pacjentów po podaniu krwi lub jej składników zakażonych pałeczkami *Y. enterocolitica* (10).

Pałeczki *Y. enterocolitica* dostają się do organizmu człowieka w wyniku spożycia zanieczyszczonej żywności, głównie wieprzowiny bądź w wyniku przetoczenia zakażonej krwi lub jej składników. Dzięki posiadaniu szeregu czynników zjadliwości, takich jak białka InvA, MyfA, YadA oraz Ail a także lipopolisacharydom (LPS) drobnoustroje te zdolne są do inwazji układu pokarmowego oraz nabywają oporność na bakteriobójcze właściwości układu dopełniacza surowicy ludzkiej.

UKŁAD DOPEŁNIACZA – MECHANIZMY AKTYWACJI

Układ dopełniacza (komplement, ang. complement) to system kaskadowo aktywowanych białek pełniących znaczącą rolę w walce przeciwko czynnikom patogennym, w utrzymywaniu stanu homeostazy gospodarza oraz wzbudzaniu stanu zapalnego (19). System ten tworzy 40 białek błonowych oraz rozpuszczalnych. Aktywacja układu komplementu może zachodzić trzema odrębnymi ścieżkami reakcji: drogą alternatywną, klasyczną i lektynową. Aktywacja tymi drogami układu dopełniacza jest również charakterystyczna dla *Y. enterocolitica*.

Aktywacja układu dopełniacza drogą klasyczną uzupełnia działanie mechanizmów swoistych nabytych i jest inicjowana kompleksem przeciwciało-antygen. Droga alternatywna przedstawia wrodzoną odpowiedź immunologiczną i jest stale, w sposób spontaniczny aktywowana gdy składowa dopełniacza wiąże się do powierzchni patogenu. Aktywacja drogą lektynową jest inicjowana gdy białka dopełniacza zwiążą się ze strukturami patogenów zawierającymi mannozę lub inny cukrowy składnik (18,19).

W normalnych, fizjologicznych warunkach układ dopełniacza jest spontanicznie aktywowany poprzez ścieżkę alternatywną. Aktywacja szlaku alternatywnego odbywa się we krwi spontanicznie, a więc inicjacja tego szlaku nie jest skutkiem pobudzenia przez kompleks immunologiczny, czy przez reszty cukrowe znajdujące się na powierzchni bakterii, lecz jest wynikiem braku fizjologicznego hamowania aktywacji. Ścieżka ta stale monitoruje w organizmie obecność komórek bakterii Gram-ujemnych, grzybów, *Protista* czy komórek nowotworowych. W warunkach aktywacji czynnik B wiąże się do formy C3 określanej jako C3b-podobną pobudzoną formą C3. Pozwala to na rozłożenie czynnika B przez czynnik D na części Bb i Ba. Następnie powstaje C3bBb, nazywana konwertazą C3 drogi alternatywnej, dzięki której ze składnika C3 powstają C3a i C3b. Głównym enzymem tego szlaku jest konwertaza C3 (C3bBb) aktywowana w wolnym tempie w osoczu. Konwertaza C3 tego szlaku stabilizowana jest przez properdynę chroniącą przed czynnikami regulującymi dopełniacz, H oraz I. Charakterystycz-

nym zjawiskiem w aktywacji komplementu tym sposobem jest wzmocnienie, ponieważ C3b – produkt reakcji konwertazy C3 jest zarazem składową tejże konwertazy. Im więcej powstanie C3b, tym więcej powstanie konwertazy C3 z połączenia czynników B i D. Konwertazy C3 szlaku klasycznego i alternatywnego są homologami rozkładającymi składnik C3 w ten sam sposób. Gdy do C3bBb przyłączy się kolejny składnik C3b powstanie konwertaza C5 drogi alternatywnej (kompleks C3bBb3b) o zdolności rozkładu C5. Od tego momentu dalsze wydarzenia aktywacji dopełniacza są wspólne dla szlaku klasycznego i alternatywnego (18,19).

Aktywacja komplementu drogą klasyczną rozpoczyna się gdy następuje związanie przeciwciał klasy IgG i IgM z antygenem komórki obcej dla organizmu gospodarza. Jest to sygnał do aktywowania w odpowiedniej kolejności białek dopełniacza. Składową C1 w warunkach fizjologicznych złożona jest z dwóch podjednostek: C1q oraz tetrameru C1r₂s₂. Białko C1q nie jest zdolne do łączenia wolnej, pentametrycznej IgM. Białko C1q przyłącza się do regionu Fc immunoglobuliny związanej z antygenem. Gdy immunoglobulina IgM połączy się z antygenem, zmienia swoją konformację na „kraba” lub „klamrę”, która bardziej ekspozuje miejsce wiązania dla kompleksu C1. C1q wywołuje zmiany w konformacji C1r i C1s, co aktywuje właściwości proteolityczne. Pobudzone białko C1s rozkłada składową C4 na C4a i C4b. C4b kowalencyjnie wiąże się z docelową błoną komórkową i wiąże składową C2. Komponent C2 w formie związanej z C4b ulega rozkładowi przez C1s na C2a i C2b. Po tym cięciu enzymatycznym powstaje pierwsza konwertaza drogi klasycznej o właściwościach proteolitycznych składająca się z kompleksu C4b2b, ale nazywająca się konwertazą C3. Powstała konwertaza rozkłada składnik dopełniacza C3 na C3b i C3a. Powstały składnik C3b łączy się z błoną komórki atakowanej i tworzy z C4b2a kompleks C4b2a3b nazywany konwertazą C5 drogi klasycznej hydrolizującą komponent C5. Konwertaza C5 rozkłada składnik C5 na C5a i C5b. Do C5b przyłączają się kolejno C6, C7, C8 i C9. Do kompleksu C5b6 przyłączają się kolejne składniki, które wbudowują się w błonę komórkową (18,19).

Aktywacja drogi lektynowej inicjowana jest przez białko wiążące mannozę (ang. mannose binding protein, MBP). Białko MBP nazywane jest zamiennie lektyną wiążącą mannozę (ang. mannose binding lectin, MBL). Lektyna ta wiąże reszty cukrowe obecne na powierzchni komórek mikroorganizmów, takie jak N-acetyloglukozamina, D-mannoza, L-fukoza, maltoza, D-glukoza, galaktoza, czy N-acetylogalaktozoamina. Funkcjami MBP (MBL) jest aktywacja układu dopełniacza, ułatwianie fagocytozy, często nazywanej z tego powodu lektynofagocytozą. Białko wiążące mannozę współdziała z proenzymami MASP-1 i MASP-2 (ang. MBL-associated serine protease). Współpraca ta wywołuje zmiany konformacyjne i aktywację. MASP-1 nabywa zdolność do rozkładu C2 i C3, natomiast MASP-2 rozkłada C4 i C2. Po powstaniu składowych C4b oraz C3b powstają konwertazy C3 i C5 niezbędne w dalszym aktywowaniu układu dopełniacza (18,19).

Kompleksy C4b2b3b drogi klasycznej oraz C3bBb3b drogi alternatywnej doprowadzają do rozkładu C5 oraz do powstania C5b przyłączającego kolejne składniki. Przyłączenie składnika C7 stanowi sygnał dla zmian w konformacji kompleksu, zmianę z hydrofilowego w hydrofobowy charakter, co umożliwia trwałe wbudowanie się kanału w błonę bakterii. Z chwilą przyłączenia się C8 rozpoczyna się tworzenie kanału w błonie komórkowej. Średnica kanału zależy od ilości związanych składników C9. Zestaw składników C5b6789 tworzy w pełni uformowany kanał w błonie komórki atakowanej przez dopełniacz określany jako kompleks atakujący błonę (ang. membrane attack complex, MAC). Zewnętrzna powierzchnia kanału MAC jest hydrofobowa, a więc umożliwia interakcje i penetrację w dwuwarstwie

lipidowej błony bakteryjnej. Natomiast powierzchnia wewnętrzna jest hydrofilowa, więc umożliwia wypływ wody i składników komórkowych. Następstwami wbudowania kanału MAC w dwuwarstwą lipidową jest utrata homeostazy, utrata gradientu protonów, wnikanie lizozymu do wnętrza komórki, zniszczenie patogenu przez fagocyty. W skutek wypływu jonów, ATP, makromolekuł, innych składników następuje liza komórek bakteryjnych (18,19).

UKŁAD DOPEŁNIACZA – REGULACJA

Układ dopełniacza posiada zdolność do tworzenia kanałów w błonie komórkowej, potrafi indukować fagocytozę i degranulować mastocyty, jest więc potencjalnym zagrożeniem dla komórek własnego organizmu. Występuje szereg białek, które mają za zadanie regulować i kontrolować kaskadę reakcji układu komplementu oraz chronić własne komórki przed jego działaniem (Tabela I). Mechanizmy i czynniki regulujące podzielono na błonowe (receptor CR1, czynnik przyspieszający rozpad (DAF), błonowy kofaktor białkowy (MCP), czynnik restrykcji homologicznej (HRF), białko wiążące C8) oraz osoczowe (inhibitor C1, białko wiążące C4-C4bp, czynnik I, czynnik H, inaktywatory anafilatoksyn, witronektyna- białko S, properdyna).

Tabela I. Funkcje czynników regulujących układ dopełniacza (18, 19, 21).

Czynnik regulujący układ dopełniacza	Funkcja
Karboksypeptydazy N i R	Inaktywacja anafilatoksyn C3a, C4a, C5a - ochrona przed stanem zapalnym skierowanym na własne komórki organizmu
Witronektyna	Inhibitor dla formowania MAC poprzez wiązanie składowej C8 i/ lub C9 do kompleksu C5b67 lub poprzez hamowanie inkorporacji C5b67 do błony komórkowej
Properdyna	Aktywator dla szlaku alternatywnego aktywacji układu dopełniacza. Stabilizacja kompleksów konwertaz C3 (C3bBb) oraz C5 (C3bBb3b), ochrona konwertaz przed rozpadem, wydłużanie czasu ich półtrwania
Receptor CR1	Kofaktor dla czynnika I, wiązanie C4b z równoczesnym usuwaniem C2a bądź wiązanie C3b z usuwaniem Bb z kompleksu
Czynnik przyspieszający rozpad, DAF	Hamowanie powstawania i przyspieszania rozpadu konwertaz C3 i C5 klasycznej i alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza. Uwalnianie C2b z konwertazy C3 drogi klasycznej oraz Bb z konwertazy C5 drogi alternatywnej
Błonowy kofaktor białkowy, MCP	Wiązanie C3b i C4b w formie związanej w konwertazie lub wolnej. Kofaktor dla czynnika I
Czynnik restrykcji homologicznej HRF i	Hamowanie tworzenia MAC poprzez wiązanie C8 i C9 lub hamowanie polimeryzacji C9.
Protektyna	Inhibitor tworzenia MAC w błonie, hamowanie przyłączenia się C8 do C5b67 - hamowanie inicjacji formowania kanału poprzez wiązanie C8

Inhibitor C1 jest inhibitorem proteaz serynowych, wiąże aktywne C1s oraz C1r, uniemożliwiając dalszą aktywację układu dopełniacza. Zabezpiecza przed skutkami spontanicznej aktywacji układu dopełniacza. Potrzebne są dwie cząsteczki inhibitora C1 do związania odpowiednio C1s i C1r by doprowadzić do dezintegracji struktury pentametu białka C1 (C1s₂C1r₂C1q). Białko wiążące C4- C4bp przyspiesza rozpad kompleksu C4b2a (konwertaza C3 drogi klasycznej). Analogiczne działanie charakteryzuje czynnik H, który usuwa Bb z kompleksu C3bBb (konwertaza C3 drogi alternatywnej) oraz uwrażliwia na działanie czynnika I. Raz związany składnik C3b z czynnikiem H, sprawia że C3b staje się dostępny dla czynnika I i jest cięty w dwóch miejscach co doprowadza do powstania inaktywowanej składowej iC3b. Czynnik I jako proteaza serynowa inaktywuje również C4b z pomocą kofaktorów. Inaktywacja ta polega na cięciu C4b na C4c i C4d. Kofaktorami dla czynnika I są wymienione C4bp oraz czynnik H. W Tabeli I umieszczono funkcje pozostałych czynników regulujących układ dopełniacza (18,19).

Tabela II. Budowa wybranych Antygenów-O lipopolisacharydu wśród różnych serotypów *Y. enterocolitica*.

Serotyp	LPS	Literatura
O:3	homopolimer β -(1 \rightarrow 2)-6-deoxy-L-altropyranoza	(14)
O:8	rozgałęziony heteropolisacharyd zawierający GalpNAc, Galp, L-fukopyranoza, D-mannopyranoza, and 6-deoxy-D-gulopyranoza	(2)
O:9	N-formylperozamina	(2)

JERSINIOZA OGÓLNOUSTROJOWA

Oporność *Y. enterocolitica* na działanie układu dopełniacza jest przyczyną wywołania przypadków bakteriemii, jersiniozy ogólnoustrojowej czy jersiniozy jatrogennej na skutek przetoczenia zakażonej krwi i/lub jej składników. Pierwszy przypadek jersiniozy poprzetoczeniowej odnotowano w Holandii w roku 1975 (4). Źródłem zakażenia krwi i lub jej składników są na ogół dawcy krwi, którzy przed donacją krwi przechodzili samoograniczającą się biegunkę a następnie bezobjawową bakterięmię. Jersinioza poprzetoczeniowa wynika ze zdolności *Y. enterocolitica* do namnażania się w surowicy krwi ludzkiej dawcy oraz przetrwanie w składnikach pobranej krwi, takich jak koncentrat krwinek czerwonych (KKCz) w temperaturze 1-6°C (20,25). W KKCz glukoza i adenina dodane wraz z płynem konserwującym i antykoagulującym są źródłem węgla, i energii do wzrostu *Y. enterocolitica*. Ponadto pH KKCz równe 7,3 jest optymalne do wzrostu *Y. enterocolitica*. Następnym przetoczenia zakażonej krwi lub jej składników jest posocznica występująca u biory. Śmiertelność będąca wynikiem obecności bakterii we krwi wśród udokumentowanych 55 przypadków w latach 1975-2007 wynosiła aż 54,5% (12,25). Zatem jersinioza poprzetoczeniowa nie jest zjawiskiem powszechnym, jednakże jej przebieg jest bardzo ciężki. Znane w literaturze przypadki jersiniozy w wyniku przetoczenia krwi i lub jej składników notowane były od roku 1975. Posocznica wywołana pałeczkami serotypu O:9 ze skutkiem śmiertelnym odnotowana była u kobiety po kilku dniach od porodu (9). W 2007 roku u 23-letniego mężczyzny z objawami nawracającej odmy płucnej po podaniu

KKCz pojawiły się objawy wstrząsu krwotocznego oraz niewydolność wielonarządowa (13). Wśród pacjentów z nadmiernym stężeniem żelaza we krwi ryzyko posocznicy wywołanej przez *Y. enterocolitica* jest znacznie wyższe. Opisano przypadek 5-letniego dziecka z wrodzoną niedokrwistością sideroblastyczną z objawami gorączki oraz infekcją jelitową wywołaną przez *Y. enterocolitica* O:3 (11). Prawdopodobną przyczyną rozwoju jersiniozy u dziecka był kontakt z jeleniem w trakcie wizyty w ogrodzie zoologicznym. Anemia sideroblastyczna dziecka promowała rozwój *Y. enterocolitica*, a infekcja doprowadziła do wielu ropni śledziony i wątroby (11). Kolejnym znanym śmiertelnym przypadkiem jersiniozy poprzetoczeniowej jest infekcja wywołana pałeczkami *Y. enterocolitica* bioserotypu 4/O:3 po podaniu KKCz 71-letniemu pacjentowi, diabetykowi z anemią po przebytej operacji serca (16). Objawami kolejno pojawiającymi się po przetoczeniu KKCz była gorączka, dreszcze, ból brzucha, cyjanoza, zespół ostrej niewydolności oddechowej prowadzące do śmierci (16). Autotransfuzja krwi pacjentów po przebytej jersiniozie jelitowej również może skutkować pojawieniem się objawów zakażenia ogólnoustrojowego. Przechodzącej operację 13-letniej pacjentce podano 4 jednostki KKCz, pobrane przed zabiegiem, mimo iż na kilka dni przed donacją pacjentka skarżyła się na objawy łagodnej biegunki. Po podaniu KKCz u pacjentki rozwinęły się objawy gorączki, niedociśnienie oraz kwasica metaboliczna z obniżeniem stężenia dwuwęglanu w surowicy (1). Szok septyczny wywołany podaniem autologicznego KKCz jest dowodem na zdolność *Y. enterocolitica* do wywoływania bakteriemii a następnie namnażania się w składnikach krwi (1). W literaturze pojawiają się opisy przypadków szoku septycznego wśród biorców krwi, którym przetoczono składnik krwi od dawcy przechodzącego w przed donacją infekcję układu pokarmowego o charakterze samoograniczającym (29).

Zaproponowano wdrożenie kilku zasad, które mogłyby zredukować liczbę przypadków jersiniozy poprzetoczeniowej. Pierwszą jest dokładne weryfikowanie historii dawców krwi pod względem przebytych od 3,5 do 6 miesięcy przed donacją infekcji układu pokarmowego. Jednakże zasada ta może spowodować eliminację zbyt wielu dawców krwi, a tym samym zmniejszy ilość krwi potrzebną w krwiodawstwie. Drugą proponowaną zmianą jest skrócenie czasu przechowywania KKCz z 42 do 21-25 dni, z uwagi na fakt, iż najwięcej infekcji jersiniozy jatrogennej jest wywoływane przez starsze składniki krwi. Zaproponowano wprowadzenie konieczności badania składników krwi pod względem występowania przeciwciał przeciwko *Y. enterocolitica*, co mogłoby spowodować wzrost kosztów donacji krwi, jednakże pomogłoby wskazać potencjalną przebytą infekcję wśród dawców. Powszechnie stosowaną zasadą w wielu krajach europejskich jest leukodeplecja, czyli oddzielenie składników krwi od białych krwinek dzięki zastosowaniu specjalnych filtrów, co może potencjalnie obniżyć ryzyko zakażeń składników krwi o około 80%. Ostatnią propozycją jest badanie pod względem bakteriologicznym składników krwi, które byłoby najskuteczniejszą a zarazem kosztowną i czasochłonną metodą weryfikacji bezpieczeństwa krwi i jej składników (16). W Polsce zgodnie z obowiązującym obwieszczeniem Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 roku preparatyka KKCz powinna być wykonana podczas jednego etapu, najszybciej jak to możliwe po zakończeniu donacji. Preparatyka ta obejmuje wirowanie, kontrolę wizualną oraz usunięcie kożuszka leukocyarno-płytkowego. Wśród testów kontroli jakości KKCz nie występują badania bakteriologiczne natomiast wśród podanych możliwych powikłań po podaniu KKCz jest posocznica spowodowana zakażeniem bakteryjnym składnika (6). Na podstawie obowiązującego obwieszczenia ru-

tynowej kontroli bakteriologicznej nie podlegają te składniki krwi, których preparatyka prowadzona jest w zamkniętym systemie pojemników z tworzyw sztucznych. Kontrola taka jest niezbędna jedynie w procesie walidacji zgrzewarki do sterylnego łączenia drenów oraz walidacji odkażania miejsca wkłucia (6).

LIPOPOLISACHARYD (LPS)

Lipopolisacharyd znany również jako endotoksyna, jest główną strukturą zewnętrzną warstwy błony zewnętrznej *Y. enterocolitica*. Hydrofobowa część LPS – lipid A jest odpowiedzialna za toksyczność, podczas gdy hydrofilowa część – oligosacharyd rdzenia oraz antygen O za właściwości serologiczne. Biosynteza LPS u *Yersinia* sp. podlega silnej termoregulacji. W temperaturze 37°C dochodzi do skrócenia długości łańcucha O-swoistego. Geny odpowiedzialne za biosyntezę składowych LPS to *rfb*, *rfa*. Stwierdzono, że locus *rfb* składa się z dwóch operonów, z czego ekspresja jednego z nich podlega represji w 37°C. W wyniku tej represji syntetyzowany jest antygen O znacznie krótszy niż w 25°C. W 25°C LPS u *Y. enterocolitica* 2/O:9 określany jest jako półszorstki natomiast szczep *Y. enterocolitica* 1B/O:8 (8081v) w tej temperaturze wytwarza LPS typu gładkiego. W 37°C szczepy 2/O:9 oraz 1B/O:8 (8081v) tworzą skrócone podjednostki łańcucha O-swoistego. Badania nad LPS *Y. enterocolitica* 2/O:9 (5,28) potwierdziły, że temperatura 37°C powoduje represję ekspresji jednego z dwóch operonów kodujących składowe LPS, co skutkuje skróceniem antygenu O. Zmniejszenie frakcji antygenu O i oligosacharydowego rdzenia pozwala na większą prezentację białka błonowego Ail w błonie zewnętrznej (ang. outer membrane, OM). Tym samym można przypisać LPS funkcję ochronną na początku infekcji na etapie kolonizacji jelita, adhezynie Ail na dalszych jej etapach, natomiast białko YadA umożliwia długoterminowe przeżycie *Y. enterocolitica* w tkankach gospodarza. Ponadto Biedzka-Sarek i wsp. (3) przypuszczają, iż skrócenie LPS ma istotne znaczenie w nadawaniu oporności na działanie układu dopełniacza, jako że antygen O jest celem dla przeciwciał i lektyn i tym samym wzmocnieniem aktywacji dopełniacza przez ścieżkę klasyczną i lektynową.

ADHEZYNA YADA

Obecność adhezyny YadA jest charakterystyczna dla gatunków chorobotwórczych w obrębie rodzaju *Yersinia*. Adhezyna eksponowana w OM jest homotrimerem o masie około 200-240 kDa. W strukturze homotrimeru widoczne są części: na C-końcu kotwica, trzon i globularna głowa na N-końcu. Geny *yadA* kodujące białko YadA znajdują się na plazmidzie wirulencji pYV i ulegają ekspresji w temperaturze 37°C. Aktywatorem transkrypcji jest VirF (LcrF). W budowie YadA wyróżnia się regiony hydrofobowe o charakterze konserwatywnym w obrębie gatunku oraz regiony hydrofilowe zmienne. Taka struktura sugeruje, że regiony hydrofobowe są istotne dla struktury i funkcji biologicznych YadA. Białko zbudowane jest z 422-455 reszt aminokwasowych. YadA zawiera 25 aminokwasową sekwencję sygnałną odcinaną w trakcie translokacji do błony zewnętrznej. Adhezyna w kształcie „lizaka” ma wymiary 1,5-2 nm średnicy oraz 50-125 nm długości (7). YadA wystaje 30 nm ponad błonę zewnętrzną i pokrywa powierzchnię bakterii. Gęsta warstwa YadA stanowi barierę zapobiegającą opsonizacji i tworzeniu kanału atakującego błonę (ang. Membrane Attack Complex, MAC) (17).

YadA nadaje właściwości hydrofobowe komórkom bakteryjnym. Ponadto pełni szereg innych właściwości biologicznych. Posiada zdolność wiązania się do kolagenu, laminin, fibronektyn oraz śluzówki jelita. Dzięki silnym właściwościom hydrofobowym komórki *Y. enterocolitica* są zdolne do autoaglutynacji (7, 28). Wiązanie do kolagenu, macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza jest niezbędnym i podstawowym czynnikiem wirulencji umożliwiającym kolonizację, przeżycie w warunkach zewnątrzkomórkowych w tkankach gospodarza. Wiązanie kolagenu zachodzi z bardzo wysokim powinowactwem do specyficznego miejsca, którym jest łańcuch $\alpha 1$ kolagenu. Globularna głowa na N-końcu posiada ośmiokrotnie powtórzony motyw NSVAIGXXS pełniący główną rolę w wiązaniu kolagenu. Poza wiązaniem kolagenu, YadA rozpoznaje i wiąże się do fragmentu E1 laminin oraz do fibronektyn (7). Wiązanie kolagenu zachodzi swobodnie, jednak interakcja jest stabilna, odporna na wysoką temperaturę i pH. Wraz ze wzrostem hydrofobowości osłon komórkowych, komórki bakterii stają się bardziej odporne na mechanizmy obronne gospodarza. Agregacja komórek bakterii w większe skupiska utrudnia dostęp komórek układu immunologicznego do tych komórek bakterii, które znajdują się w wewnętrznych partiach skupisk. YadA pośredniczy w obronie przed fagocytozą neutrofilów. Obrona ta polega na wiązaniu do wielojądrowych komórek krwi za pomocą YadA, następnie wstrzyknięciu białek efektorowych YopE i YopH do wnętrza komórek eukariotycznych za pomocą III typu sekrecji.

YadA nadaje oporność komórkom bakterii na surowicę dzięki łączeniu się bezpośrednio do osoczowego czynnika H, oraz do C4bp (ang. C4-binding protein) regulujących aktywację dopełniacza. Czynniki H promuje dysocjację konwertazy C3, zapobiega jej powstawaniu oraz działa jako kofaktor dla czynnika I degradującego składową C3b. Jeżeli czynniki H zostanie związany z YadA to uaktywnia swoje działanie. Podobne skutki następują po związaniu drugiego wspomnianego czynnika, C4bp przyspieszającego rozpad kompleksu C4b2a. Dzięki tym mechanizmom mniejsza ilość C3b i C9 (C5b-9) składowych dopełniacza deponowanych jest na błonie zewnętrznej zawierającej YadA (23). Wiązanie C4bp chroni przed aktywacją dopełniacza drogą klasyczną, z udziałem przeciwciał oraz drogą lektynową. Aktywacja czynnika H dzięki YadA chroni *Y. enterocolitica* przed działaniem alternatywnej ścieżki aktywacji komplementu (15). Badania Schindler i wsp. (26) wskazują, iż białko YadA może również pośrednio przyciągać czynniki H na powierzchnię błony bakterii poprzez wiązanie się do C3b. Czynniki H związany z C3b jest cięty przez czynniki I co generuje iC3b a tym samym powstawanie MAC jest ograniczone.

Prace zespołu Mühlenkamp i wsp. (21) dostarczyły nowych dowodów określających inny możliwy mechanizm interakcji białka YadA *Y. enterocolitica* 1B/O:8 z białkami układu komplementu. W pracy oceniono, iż białko YadA wiąże się z witronektyną (Tabela I) co prowadzi do redukcji formowania i deponowania kompleksu C5b-9 w bakteryjnej błonie zewnętrznej, a tym samym do zwiększenia oporności na dopełniacz. Autorzy dowiedli, iż serotyp O:9 ekspozuje dodatkowy odcinek w domenie głowy białka YadA, który cechuje się wysokim powinowactwem do witronektyny (22).

BIĄŁKO ADHEZYJNO-INWAZYJNE AIL

Czynnikiem wirulencji kodowanym przez chromosomowy przez gen *ail* jest białko Ail. Gen *ail* występuje w genomie patogennych biotypów 2, 3, 4, 5 *Y. enterocolitica*. Nie-

mniej jednak notowane są przypadki detekcji tego genu wirulencji wśród niepatogennego biotypu 1A *Y. enterocolitica* (24,27). Ekspresja Ail zachodzi w podobnych warunkach co ekspresja YadA, czyli w 37°C oraz w fazie logarytmicznego wzrostu bakterii w temperaturze 30°C. Białko Ail jest β -baryłką złożoną z 8 wstęg i 4 pętli o masie 17 kDa. Ail zapewnia wiązanie i inwazję do komórek nabłonkowych. Ponadto ochrania komórki bakteryjne przed bakteriobójczą aktywnością dopełniacza, jednak w mniejszym stopniu niż YadA. Dzieje się tak, ponieważ Antygen O oraz rdzeń zewnętrzny oligosacharydu LPS maskują Ail na błonie zewnętrznej. Oporność na surowicę *Y. enterocolitica* posiadających w OM białko Ail wynika z wiązania tego białka do czynnika H i C4bp (17).

POZOSTAŁE CZYNNIKI WIRULENCJI *Y. ENTEROCOLITICA* ZWIAZANE Z NADAWANIEM OPORNOŚCI NA DOPEŁNIACZ

Poryna dyfuzji ogólnej OmpC należy do białek głównych *Enterobacteriaceae* i występuje w błonie zewnętrznej w dużych ilościach. Ponadto może pełnić funkcje czynnika wirulencji, białka receptorowego dla fagów i kolicyn. OmpC charakteryzuje się budową trimeryczną, w której monomer jest β -baryłką składającą się z 16 nici. Ekspresja poryny u *Y. enterocolitica* regulowana jest systemem regulacji EnvZ/OmpR (28). Ekspresja poryny zależy od warunków środowiska. OmpC jest ekspresjonowane w warunkach wysokiej osmolarności środowiska, w przeciwieństwie do swojego homologu OmpF, któremu sprzyjają warunki niskiej osmolarności i wysoki poziom cAMP. Dzięki systemowi EnvZ/OmpR komórka bakteryjna dostosowuje ekspresję tej poryny, która jest preferowana w odpowiednich warunkach środowiska. OmpC jest niespecyficzną poryną dyfuzji ogólnej, kanałem jonowym dla rozpuszczalnych składników przepuszczającym przez błony bakteryjne. Badania nad funkcją białka OmpC u *Y. enterocolitica* dowiodły, że poryna ta wraz z OmpF nadają oporność na antybiotyki β -laktamowe. Ponadto poryna OmpC wpływa na poziom wrażliwości *Y. enterocolitica* na surowicę ludzką. Badania nad mutantem genetycznym *Y. enterocolitica* 2/O:9 pozbawionym ekspresji *ompC* wskazują na bardzo dużą wrażliwość na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej (28). Badania własne wskazują również na rolę OmpC w nadawaniu oporności *Y. enterocolitica* na działanie surowicy końskiej i bydlęcej (20). Badania te dowodzą, że poryna ekspozowana w błonie zewnętrznej stanowi element obronny przed bakteriobójczą aktywnością surowicy (20,28). Ponadto dowiedziono, iż układ dopełniacza surowicy końskiej oraz bydlęcej jest aktywowany niezależnie od obecności białka OmpC w błonie zewnętrznej *Y. enterocolitica* 2/O:9 (20).

PODSUMOWANIE

Układ dopełniacza jako element wrodzonej odpowiedzi immunologicznej jest pierwszą linią obrony gospodarza przed *Y. enterocolitica*. Bakterie te są zdolne do wywoływania bezobjawowej bakterii oraz ogólnoustrojowego zakażenia dzięki zdolności do hamowania aktywacji komplementu w wyniku wiązania czynników regulujących dopełniacz takich jak C4bp, czynnik H bądź witronektynę. W zjawisku tym rolę pełnią czynniki wirulencji takie jak YadA, Ail, OmpC czy LPS ulegający skróceniu w temperaturze 37°C.

PIŚMIENNICTWO

1. Benavides S, Nicol K, Koranyi K, Nahata MC. *Yersinia* septic shock following an autologous transfusion in a pediatric patient. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis* 2003; 28: 19–23.
2. Białas N, Kasperkiewicz K, Radziejewska-Lebrecht J, Skurnik M. Bacterial cell surface structures in *Yersinia enterocolitica*. *Arch Immunol Ther Exp* 2012; 60: 199–209.
3. Biedzka-Sarek M, Venho R, Skurnik M. Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun* 2005; 73: 2232–44.
4. Bruining A, De Wilde-Huizen CCM. A case of contamination of donor blood by *Yersinia enterocolitica* type 9. *Med Ned* 1975; 4: 25–6.
5. Brzostek K. Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. *Postępy Mikrobiol* 2004; 43: 7–38.
6. DZIENNIK URZĘDOWY Ministra Zdrowia, Dziennik Urzędowy. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi. Warszawa, 2017. [http://www.rckik.wroclaw.pl/userfiles/files/obwieszczenie\(1\).pdf](http://www.rckik.wroclaw.pl/userfiles/files/obwieszczenie(1).pdf)
7. El Tahir Y, Skurnik M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol IJMM* 2001; 291: 209–18.
8. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013. EFSA J //doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2015.3991
9. Frati P, Busardò FP, Di Stefano MA i inni. A fatal case of post-transfusion sepsis caused by *Yersinia enterocolitica* after delivery. *Blood Transfus* 2015; 13: 528–31.
10. gp_2004_1_69.pdf. http://www.chirurgia.opole.pl/pdf/gp_2004_1_69.pdf.
11. Grigull L, Linderkamp C, Sander A i inni. Multiple spleen and liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica* septicemia in a child with congenital sideroblastic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 624–6.
12. Guinet F, Carniel E, Leclercq A. Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2011; 53: 583–91.
13. Hoelen DWM, Tjan DHT, Schouten MA i inni. Severe *Yersinia enterocolitica* sepsis after blood transfusion. *Neth J Med* 2007; 65: 301–3.
14. Kasperkiewicz K, Swierczko AS, Bartłomiejczyk MA i inni. Interaction of human mannose-binding lectin (MBL) with *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2015; 305: 544–52.
15. Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M i inni. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* 2008, 4(8):e1000140.
16. Leclercq A, Martin L, Vergnes ML i inni. Fatal *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serovar O:3 sepsis after red blood cell transfusion. *Transfusion (Paris)*. 2005; 45: 814–8.

17. Leo JC, Skurnik M. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. Adv Exp Med Biol 2011; 715: 1–15.
18. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Front Immunol 2015; 6: 262
19. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L i inni. Complement System Part II: Role in Immunity. Front Immunol 2015; 6: 257.
20. Miętka K, Brzostek K, Guz-Regner K, Bugla-Płoskońska G. The mechanisms of complement activation in normal bovine serum and normal horse serum against *Yersinia enterocolitica* O:9 strains with different outer membrane proteins content. Pol J Vet Sci 2016, 19:99–107.
21. Morgan BP, Boyd C, Bubeck D. Molecular cell biology of complement membrane attack. Semin Cell Dev Biol. 2017, pii: S1084-9521(17)30346-4.
22. Mühlenkamp MC, Hallström T, Autenrieth IB i inni. Vitronectin Binds to a Specific Stretch within the Head Region of *Yersinia* Adhesin A and Thereby Modulates *Yersinia enterocolitica* Host Interaction. J Innate Immun 2017, 9: 33–51.
23. Pilz D, Vocke T, Heesemann J, Brade V. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. Infect Immun 1992; 60: 189–95.
24. Platt-Samoraj A, Syczko K, Szczerba-Turek A i inni. Presence of *ail* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A isolates from game animals in Poland. Vet J Lond Engl 2017; 221: 11–3.
25. Ramirez-Arcos S, Perkins H, Kou Y i inni. Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule. Vox Sang 2013; 105: 100–7.
26. Schindler MKH, Schütz MS, Mühlenkamp MC i inni. *Yersinia enterocolitica* YadA mediates complement evasion by recruitment and inactivation of C3 products. J Immunol Baltim Md 2012; 189: 4900–8.
27. Sihvonen LM, Hallanvuori S, Haukka K i inni. The *ail* gene is present in some *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains. Foodborne Pathog Dis 2011, 8: 455–7.
28. Skorek K, Raczowska A, Dudek B i inni. Regulatory Protein OmpR Influences the Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* O:9 by Modifying the Structure of the Outer Membrane. PlosOne 2013, 8(11): e79525.
29. Strobel E, Heesemann J, Mayer G i inni. Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis. J Clin Microbiol 2000, 38: 2788–90.

Otrzymano: 10 VII 2017 r

Adres Autora: 51-148 Wrocław, ul. S. Przybyszewskiego 63/77, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski,

Antybakteryjne działanie nanocząstek srebra syntetyzowanych metodą zielonej chemii

Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by green chemistry method

Mateusz Speruda¹, Anna Kędziora¹, Gabriela Bugla-Płoskońska¹

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

Stosunkowo nowym obszarem w dziedzinie nanotechnologii jest synteza nanocząstek srebra (AgNPs, ang. silver nanoparticles) wykorzystująca ekstrakty roślinne, będące substytutem dla obecnie stosowanych reduktorów Ag^+ i stabilizatorów nanostruktur, często zagrażających zdrowiu ludzi oraz środowisku. Wysoka aktywność biologiczna oraz zakres działania obejmujący szerokie spektrum drobnoustrojów (bakterie, grzyby, a nawet wirusy), przedstawia nanocząstki srebra w świetle potencjalnego następcy dla antybiotykoterapii. Udowodniona w literaturze bakteriobójczość „Green Synthesis AgNPs” oznacza, że tania i ekologiczna metoda zielonej chemii może znaleźć zastosowanie w medycynie, farmacji oraz innych, pozamedycznych sektorach przemysłu produkujących artykuły zawierające w swej strukturze nanosrebro (np. odzież, farby, kosmetyki).

Słowa kluczowe: nanocząstki srebra, AgNP, bakterie, zielona chemia, działanie antybakteryjne

ABSTRACT

A relatively new sector of nanotechnology bases on the synthesis of silver nanoparticles, using plant-based extracts. They substitute the current applied reducing and capping agents of nanosilver that may be harmful for human's health and the environment. Silver nanoparticles are considered as a replacement for antibiotic therapy due to its high biological activity and efficiency against wide spectrum of microorganisms (such as bacteria, fungi and viruses). Antibacterial activity of Green Synthesis AgNPs has been proven in the literature. Green chemistry method of AgNPs synthesis is a low-cost and ecological technique, so in the future, it could be used in medicine, pharmacy and other, non-medical sectors of industry producing articles with nanosilver inside its structure (such as clothes, fabrics, cosmetics).

Keywords: silver nanoparticles, AgNP, bacteria, green chemistry, antibacterial activity

WSTĘP

W obecnych czasach, zastosowanie nanotechnologii w dziedzinie nauk medycznych nie jest już niczym nowym. Rosnący problem oporności bakterii wobec antybiotyków zmusza do poszukiwania nowej generacji leków przeciwdrobnoustrojowych (10). Dlatego nadzieje wiąże się z badaniami nad nanocząstkami srebra (AgNPs) – strukturami o unikalnych właściwościach biologicznych i fizyko-chemicznych, których przynajmniej jeden z wymiarów ma mniej niż 100 nm (20, 27). W walce z drobnoustrojami chorobotwórczymi często wykorzystywane są metale ciężkie, np. srebro, ponieważ posiada najwyższą aktywność biologiczną i szerokie spektrum działania obejmujące bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, grzyby, a nawet wirusy (4, 5, 8, 12).

Wykorzystanie srebra jako czynnika antybakteryjnego sięga już czasów starożytnych. Ówczesni ludzie przechowywali wodę, wino i ocet w srebrnych naczyniach, by nie dopuścić do ich zanieczyszczenia; znane były też praktyki leczenia srebrem wrzodzących ran. W XIX wieku popularne wśród amerykańskiej ludności było wrzucanie srebrnych jednol dolarówek do kanek z mlekiem, w celu zachowania jego świeżości przez dłuższy czas (13, 22, 26). Związki tj. sulfadiazyna (SSD) czy azotan srebra (AgNO_3) wykorzystywane były w medycynie jako środki dezynfekujące w szpitalach, leki na oddziałach oparzeniowych czy preparaty stosowane w przypadku infekcji oczu u noworodków (5).

Popularność nanotechnologii przyczyniła się do rozwoju nowych gałęzi przemysłu opartych na wykorzystaniu nanocząstek srebra. Powstają innowacyjne implanty medyczne, specjalne opatrunki przyspieszające gojenie się ran, narzędzia i urządzenia biomedyczne. Nie da się ukryć, że równolegle, ale zdecydowanie szybciej, rozrasta się sektor pozamedyczny. Rynek konsumencki pełen jest artykułów zawierających nanosrebro, tj. tkaniny, ubrania, urządzenia elektryczne, farby, filtry wody, kosmetyki czy przedmioty codziennego użytku (5, 13, 22). Duży popyt na tego rodzaju wyroby poskutkował rozpoczęciem badań nad nową procedurą wytwarzania nanocząstek. Dotychczas stosowane metody chemicznej syntezy AgNPs wykorzystywały drogie i szkodliwe dla środowiska odczynniki chemiczne, stąd pomysł, by nowa technologia była ekologiczna (18). Spośród wielu rozwiązań postawiono na metodę biologicznej syntezy nanocząstek wykorzystującą różnego rodzaju ekstrakty roślinne jako reduktory jonów srebra. Powstałe w ten sposób nanocząstki określane są w literaturze mianem „Green Synthesis AgNPs” (GS-AgNPs), a sama procedura syntezy została nazwana po polsku metodą zielonej chemii (23, 25)

MECHANIZM DZIAŁANIA NANOCZĄSTEK SREBRA

Jest kilka czynników, od których zależy aktywność biologiczna zsyntetizowanych AgNPs. Pierwszym z nich jest rozmiar – im mniejsze nanocząstki, tym większa jest ich skuteczność bójcza wobec komórek bakterii (27). Znaczenie ma również kształt nanocząstek srebra, dla którego określa się stosunek powierzchni do objętości danej nanostruktury (14). Parametr ten opisuje efektywność działania AgNPs, zatem kluczowym jest, by jego wartość była jak największa. Spadek tej wartości może zostać odnotowany w przypadku samoagregacji nanocząstek srebra, dlatego często immobilizuje się je na nośnikach nieorganicznych, np. ditlenek tytanu (TiO_2) lub krzemu (SiO_2) (9, 27).

Mechanizm aktywności nanocząstek srebra nie jest jeszcze w pełni poznany i jest przedmiotem długotrwałych badań. Jego podobieństwo do sposobu działania jonów srebra wobec komórki bakteryjnej, pozwoliło na wysnucie teorii o możliwej jonizacji nanocząstki srebra i wydzielaniu Ag^+ do środowiska reakcji (29). Nanocząstki srebra wykazują powinowactwo do grup sulfhydrylowych (tiolowych) białek powodując ich denaturację i utratę pełnionej funkcji (11, 29). W ten sposób dochodzi do inaktywacji kluczowych białek enzymatycznych, w tym białek łańcucha oddechowego, co skutkuje wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i przyczynia się do szybszej śmierci mikroorganizmu na skutek stresu oksydacyjnego (15, 17). Inaktywacja enzymów przez jony srebra może przyczynić się także do zaburzenia transportu energii i metabolizmu komórkowego, bowiem unieczynnieniu ulegają również białka katalityczne zaangażowane w produkcję ATP. AgNPs mogą akumulować się w osłonach bakteryjnych, co prowadzi do zaburzenia ich struktury (15). Dochodzi wówczas do wytworzenia porów o nieregularnych brzegach, niekontrolowanego transportu jonów, deenergetyzacji błony i finalnie – śmierci komórki. Nanosrebro pod względem chemicznym jest słabym kwasem, zatem wykazuje powinowactwo do reagowania z fosforem czy siarką zawartymi w kwasach nukleinowych (15, 17). Nanocząstki wiążąc się do DNA mogą przyczynić się do zahamowania replikacji bądź jego zniszczenia. Ekspozycja bakterii na działanie AgNPs przyczynia się również do zaburzeń translacji (11, 15). Interakcje nanosrebra z rybosomem (a dokładniej z białkiem S6 w podjednostce 30S) prowadzą do zahamowania biosyntezy białek błonowych i szoku termicznego. W ten sposób mikroorganizm zostaje pozbawiony ochrony przed uszkodzeniami wynikającymi ze stresu oksydacyjnego. Charakterystyczną dla aktywności AgNPs jest inhibicja transdukcji sygnału u bakterii Gram-ujemnych (17, 24). Nanocząstki powodują defosforylację reszt tyrozynowych substratów białkowych (np. czynnika sigma polimerazy RNA czy bakteryjnego białka wiążącego ssDNA), która prowadzi do ich dezaktywacji. Rezultatem są zaburzenia w procesie rekombinacji i replikacji materiału genetycznego.

WYKORZYSTANIE ZIELONEJ CHEMII W SYNTEZIE NANOCZĄSTEK SREBRA

Najczęściej wykorzystywaną w badaniach techniką syntezy nanocząstek jest metoda chemicznej redukcji jonów do srebra metalicznego (6, 7). Jako jedna z niewielu, pozwala ona na regulowanie wielkości i kształtu AgNPs poprzez modyfikację warunków reakcji i odpowiedni dobór stężenia odczynników. Niestety, reduktory i stabilizatory wykorzystywane w tej metodzie nie są biodegradowalne, a ich toksyczność stanowi zagrożenie dla środowiska oraz zdrowia człowieka (2). Dlatego na popularności zyskują biologiczne metody syntezy nanocząstek srebra, określane jako ekologiczne (1). Jedną z nich zakłada wykorzystanie w syntezie AgNPs ekstraktów z liści, korzeni, nasion czy łodyg roślin. Sugeruje się, że naturalne, aktywne związki (np. kwas cytrynowy, limonoidy, taniny, peptydy cykliczne) zawarte w wyciągach tego typu mogłyby posłużyć jako bioreduktory jonów i stabilizatory nanocząstek srebra (18, 21). Dotychczasowe badania nad ekstraktami z cynamonu, papai, gruszek czy cytryny potwierdzają ich zdolność do formowania stabilnych AgNPs (8, 26). Nieszkodliwość dla środowiska to nie jedyna zaleta metody zielonej chemii, często podkreśla się niskie koszty prowadzenia reakcji oraz możliwość otrzymania

nanocząstki o dowolnej wielkości, po dobraniu odpowiedniego ekstraktu do redukcji Ag^+ . Stąd w literaturze pojawiło się mnóstwo badań nad zastosowaniem różnorodnych wyciągów roślinnych w syntezie AgNPs. *Jayaprakash* i wsp. (8) w swojej pracy wykorzystali sok owocu tamaryndowca indyjskiego. Użyta w badaniach procedura wytworzenia nanocząstek polegała na wymieszaniu odpowiednio rozcieńczonego ekstraktu roślinnego z AgNO_3 (źródło jonów srebra). W celu redukcji Ag^+ znajdujących się w mieszaninie wykorzystano działanie mikrofal. Otrzymano w ten sposób sferyczne AgNPs o rozmiarze 5-12 nm, których stabilność utrzymywała się przez następne sześć miesięcy. Za przypuszczalne stabilizatory nanosrebra uznano aktywne komponenty zawarte w soku owocu tamaryndowca – alkaloidy i flawonoidy opłaszczające nanostrukturę. Badania *Ronavari* i wsp. (21) skupiły się na wykorzystaniu w syntezie AgNPs produktów dostępnych w każdym domu, czyli kawy i zielonej herbacie. W wyniku eksperymentu powstały dwie, różniące się od siebie grupy nanocząstek srebra. Zsyntetyzowane C-AgNPs (C, kawa, ang. coffee) miały 8-20 nm wielkości, zaś GT-AgNPs (GT, zielona herbata, ang. green tea) charakteryzowały się rozmiarem w skali 20-50 nm. Obydwa rodzaje nanocząstek srebra miały sferyczny kształt (rezultat zmieszania AgNO_3 i ekstraktów w stosunku 1:1), jednakże GT-AgNPs cechowała większa skłonność do samoagregacji. Powierzchnie AgNPs pokrywały organiczne związki, np. alkaloidy, taniny, glikozydy, fenole, kumaryny czy białka zawierające w łańcuchach bocznych cysteinę (za ich przyłączenie odpowiadały grupy karbonylowe). Sugeruje się, że skład tego typu powłoki ma znaczenie w zapobieganiu agregacji nanocząstek, która jest zjawiskiem naturalnym w przypadku braku stabilizatora (21). Nierzadko dobór ekstraktu roślinnego do syntezy AgNPs metodą zielonej chemii jest skrupulatnie przemyślany. Przykładem są badania *Ashour* i wsp. (2) oraz *Chowdhury* i wsp. (6). Ten pierwszy w swoich badaniach wykorzystał żurawinę, ze względu na naturalne występowanie dużej ilości antyoksydantów, mogących służyć jako reduktory jonów srebra i stabilizatory nanocząstek. Wielkość powstałych w ten sposób sferycznych AgNPs zależna była od zastosowanego stężenia roztworu żurawiny i wahała się 1,4-10,1 nm. Nanostruktury opłaszczone były białkami i polifenolami, chroniącymi AgNPs przed agregacją. Wspomniane już badania *Chowdhury* i wsp. (6) skupiły się na wykorzystaniu ekstraktu z owocu kakaowca. Zawiera ono naturalny czynnik redukujący – kwas szczawiowy. Zsyntetyzowane w tej metodzie nanocząstki o sferycznym kształcie osiągały rozmiar 25-32 nm. *Ahmad* i wsp. (1) w swojej pracy zmodyfikowali powierzchnię nanocząstek zsyntetyzowanych z wykorzystaniem wyciągu z korzenia cynowodu chińskiego. Powstałe nanocząstki srebra o rozmiarach 10-20 nm, posiadały na swojej powierzchni biopolimer – chitozan, który przyczynił się do zwiększenia aktywności biologicznej nanosrebra. Interesujące badania nad wykorzystaniem aloesu zwyczajnego jako potencjalnego reduktora jonów srebra przeprowadzili *Tip-payawat* i wsp. (28). Dowiedli oni, że wielkość otrzymywanej w ten sposób nanostruktury jest zależna od temperatury gotowania mieszaniny ekstraktu z AgNO_3 . Po 6 godzinach gotowania w 100°C formowały się AgNPs o wielkości 70 ± 23 nm, zaś w 200°C powstawały nanocząstki rozmiarów 161 ± 53 nm. Proces ten dowodzi swoistego „życia nanocząstek”, czyli zmiany właściwości fizycznych pod wpływem pewnych czynników zewnętrznych (w tym przypadku temperatury). Duże rozmiary nanosrebra otrzymali w swoich badaniach *Patra* i wsp. (16), wykorzystując nasiona kukurydzy zwyczajnej; ich struktury sięgały 100-450 nm.

ANTYBAKTERYJNA SKUTECZNOŚĆ „GREEN SYNTHESIS AGNPS”
NA WYBRANYCH PRZYKŁADACH

Istnieją doniesienia, że wadą nanocząstek syntezowanych tradycyjną metodą redukcji chemicznej było występowanie w roztworze czynników redukujących, które same w sobie okazywały się toksyczne dla drobnoustrojów, np. NaBH_4 (18, 21), zwiększając tym samym toksyczność wobec organizmów wyższych (2,16). W omawianej metodzie zielonej chemii problem ten został całkowicie wyeliminowany, bowiem stosowane ekstrakty roślinne nie wykazują aktywności bójczej wobec komórek bakterii. Samo działanie przeciwdrobnoustrojowe GS-AgNPs nie zostało jeszcze tak szczegółowo opisane, jak w przypadku „nieekologicznych” nanocząstek. W literaturze spotyka się najczęściej podstawowe eksperymenty dotyczące bakteriobójczości tych związków wykorzystujące tylko metodę dyfuzyjno-krążkową; liczba prac badawczych ukazujących działanie GS-AgNPs na poziomie molekularnym jest dość mała. Jayaprakash i wsp. (8) testowali skuteczność antybakteryjną zsyntetyzowanych AgNPs na 3 szczepach bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus sp.*) i 4 szczepach bakterii Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*). Zastosowane w badaniu GS-AgNPs wykazały efektywne działanie wobec obydwu grup drobnoustrojów. Podobny wynik zaobserwowali Ronavari i wsp. (21) dla *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *M. luteus*. Niezależnie od zastosowanej nanocząstki (C-AgNP czy GT-AgNP) rezultat był podobny, preparat cechowała wysoka aktywność bójcza. Zsyntetyzowane przez zespół Ahmada i wsp. (1) nanocząstki modyfikowane chitozanem okazały się być skuteczniejsze wobec bakterii Gram-dodatnich (*B. subtilis*). Autorzy upatrują przyczyny w odmiennej budowie osłon komórkowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Według Ahmada i wsp. (1) chitozan znajdujący się na powierzchni AgNPs wiąże się elektrostatycznie z lipopolisacharydem (LPS) bakterii Gram-ujemnych i kwasami tejchojowymi bakterii Gram-dodatnich i powoduje zaburzenia w strukturze błon prowadzące do powstania perforacji i wycieku cytoplazmy. Sam chitozan jako modyfikacja AgNPs miałby wspomagać adhezję nanocząstki do powierzchni komórki, silniej oddziaływać na błonę i ułatwiać przejście AgNPs do wnętrza bakterii. Interesującą teorię dot. działania zsyntetyzowanej przez swój zespół nanocząstki (wykorzystano ekstrakt z aloesu) przedstawił Tippayawat i wsp. (28). Według niego efekt bójczy wobec *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* to wypadkowa aktywności biologicznej nanocząstki (jonizacja AgNPs i wydzielanie Ag^+) oraz aktywnych związków aloesu, które miałyby tworzyć krystaliczne struktury bioorganiczne. Związki tj. saponiny, taniny, terpenoidy, flawonoidy zawarte w ekstrakcie roślinnym są w stanie wytworzyć pory w błonie fosfolipidowej. Tippayawat i wsp. (28) zaobserwowali również, że większe nanocząstki srebra były skuteczniejsze od struktur o mniejszych rozmiarach. Do podobnych wniosków doszedł Ashour i wsp. (2), którzy swoje badania prowadzili na różnych szczepach *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Zsyntetyzowali oni nanocząstki o rozmiarach od 1,4 do 10,1 nm i to właśnie te największe okazały się być skuteczniejsze wobec bakterii Gram-ujemnych niż Gram-dodatnich (mniejsza dawka potrzebna by zabić drobnoustroje). Badanie z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazało znaczne uszkodzenia dwuwarstwy fosfolipidowej (perforacje). Ashour i wsp. (2) testowali również działanie AgNPs wobec bakterii wielolekoopornych - *Staphylococcus aureus* MRSA i opornego na antybiotyki *Pseudomonas aeruginosa*. W obydwu przypadkach działanie

GS-AgNPs było skuteczne już w małych dawkach. Znane są również prace badawcze traktujące o działaniu Green Synthesis AgNPs przeciwko formowaniu biofilmu. Qayyum i wsp. (18) prowadzili badania na szczepach *S. mutans* oraz *E. coli*. Efektywne działanie antybiofilmowe zaobserwowano w przypadku tej bakterii. Mechanizm działania nanocząstek obejmuje uszkodzenia DNA, denaturację białek powierzchniowych oraz zaburzenia szlaku sygnałnego, według autora wystąpienie tych trzech zjawisk uniemożliwia komórce bakteryjnej uformowanie biofilmu.

PODSUMOWANIE

Synteza nanocząstek srebra metodą zielonej chemii prowadzi do powstania produktu o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, gdzie koszt prowadzenia reakcji syntezy jest nieporównywalnie mniejszy niż w przypadku stosowania tradycyjnych metod redukcji chemicznej. Technologia ta ogranicza wykorzystanie szkodliwych dla środowiska odczynników chemicznych na rzecz reduktorów i stabilizatorów pochodzenia roślinnego, np. ekstraktów kawy, herbaty czy aloesu. Chociaż metoda uważana jest za przyjazną środowisku, ciężko nazwać ją w pełni ekologiczną. Rozwój przemysłu związanego z nanotechnologią i pozamedycznym wykorzystaniem nanocząstek srebra stanowi zagrożenie dla środowiska i zdrowia człowieka. Najnowsze badania donoszą o możliwości wypłukiwania nanostruktur zawartych w ubraniach i tkaninach w trakcie prania, skąd mogą przedostać się do środowiska i doprowadzić do jego skażenia (3, 23). Co więcej, stosunkowo niedawne odkrycia mówią o możliwości wygenerowania oporności u bakterii poddanych długotrwałemu działaniu nanocząstek srebra (19). Całkiem możliwe, iż nadużywanie nanocząstek w dobie spadającej efektywności antybiotyków, powoli pozbawia nas kolejnego, skutecznego sposobu walki z drobnoustrojami. Stosowanie tanich metod biologicznej syntezy AgNPs i ich wykorzystanie ma sens, gdy zostanie ograniczone do kontrolowanego użycia tylko w sektorze medycznym i farmaceutycznym.

PIŚMIENNICTWO

1. Ahmad A, Wei Y, Syed F i inni. The Effects of Bacteria-Nanoparticles Interface on the Antibacterial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Microb Pathog.* 2017; 102: 133–42.
2. Ashour AA, Raafat D, El-Gowelli HM, El-Kamel AH. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Cranberry Powder Aqueous Extract: Characterization and Antimicrobial Properties. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 7207–21.
3. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabric. *Environ Sci Tech* 2008; 42 (11): 4133–9.
4. Bugła-Płoskońska G, Jasiorski M, Leszkiewicz A i inni. Bakteriobójcze działanie immobilizowanych preparatów srebra i możliwość ich praktycznego zastosowania. *Farm Przegł Nauk* 2008; 2: 23–6.
5. Bugła-Płoskońska G, Leszkiewicz A. Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowanie w medycynie. *Kosmos, problemy nauk biologicznych* 2007; 56: 115–22.
6. Chowdhury NR, MacGregor-Ramiasa M, Zilm P i inni. Chocolate[®] Silver Nanoparticles: Synthesis, Antibacterial Activity and Cytotoxicity. *J Colloid Interface Sci* 2016; 482: 151–8.

7. *Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B*. Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical and Biological Methods. *Res Pharm Sci* 2014; 9: 385–406.
8. *Jayaprakash N, Vijaya JJ, Kaviyarasu K* i inni. Green Synthesis of Ag Nanoparticles Using Tamarind Fruit Extract for the Antibacterial Studies. *J Photochem Photobiol B* 2017; 169: 178–85.
9. *Kędziora A, Stręk W, Kępiński L* i inni. Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. *J Solgel Sci Technol* 2012; 62: 79–86.
10. *Lara HH, Ayala–Nunez NV, Turrent L, Padilla C*. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 615–621.
11. *Lok CN, Ho CM, Chen R*. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* 2006; 5: 916–24.
12. *Lu L, Sun RW, Chen R* i inni. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther.* 2008; 13: 253–62.
13. *McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S* i inni. Silver Nanoparticles in the Environment: Sources, Detection and Ecotoxicology. *Sci Total Environ* 575: 231–46.
14. *Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K*. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16: 2346–53.
15. *Pal S, Tak YK, Song JM*. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 1712–20.
16. *Patra JK, Baek KH*. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. *IET Nanotechnology* 2015. doi: 10.1049/iet-nbt.2015.0102
17. *Prabhu S, Poulouse EK*. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2012; 2: 32.
18. *Qayyum S, Khan AU*. Biofabrication of broad rang antibacterial and antibiofilm silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnology* 2015. doi: 10.1049/iet-nbt.2015.0091
19. *Randall CP, Gupta A, Jackson N* i inni. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 2015, 70: 1037–46.
20. Recommendation of European Union 2011/696/EU. Official Journal of the European Union L 275, 20.10.2011 (https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf).
21. *Rónavári A, Kovács D, Igaz N* i inni. Biological Activity of Green-Synthesized Silver Nanoparticles Depends on the Applied Natural Extracts: A Comprehensive Study. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 871–83.
22. *Senjen R, Illuminato I*. Nano & biocidal silver. Extreme germ killers present a growing threat to public health – report 2007 (http://www.foe.org/system/storage/877/b3/3/636/Nano_and_biocidal_silver.pdf)
23. *Sharma VK, Yngard RA, Lin Y*. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2009; 145: 83–96.

24. *Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G.* Characterization of enhanced antibacterial effects of novel nanoparticles. *Nanotechnology* 2007; 18. doi: 10.1088/0957-4484/18/22/225103
25. *Siemienieć J, Kruk P.* Synteza nanocząstek srebra oraz złota metodami zielonej chemii. *Chemik* 2013; 67: 842-7.
26. *Srikar SK, Giri DD, Pal DB i inni.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A review. *Green and Sustainable Chemistry* 2016; 6: 34-56.
27. *Thiel J, Pakstis L, Buzby S, Raffi M.* Antibacterial Properties of Silver-Doped Titania. *Small* 2007; 3: 799-803.
28. *Tippayawat P, Phromviyo N, Boueroy P, Chompoosor A.* Green Synthesis of Silver Nanoparticles in Aloe Vera Plant Extract Prepared by a Hydrothermal Method and Their Synergistic Antibacterial Activity. *PeerJ* 2016; 4. doi: 10.7717/peerj.2589
29. *Xiu ZM, Ma J, Alvarez P.* Differential Effect of Common Ligands and Molecular Oxygen on Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Versus Silver Ions. *Environ Sci Technol* 2001; 45: 9003-8.

Otrzymano: 14 VII 2017 r.

Adres Autora: 51-148 Wrocław, ul. Przybyszewskiego 63/77, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

Serologiczna diagnostyka bakteryjnych zakażeń człowieka –
błędy popełniane w wyborze i wykonaniu badań laboratoryjnych
oraz w interpretacji ich wyników

Serological diagnosis of bacterial infections –
mistakes in the selection and execution of laboratory tests
and in interpretation of the results

Waldemar Rastawicki

Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego –
Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

W pracy przedstawiono w praktycznym ujęciu najczęstsze błędy popełniane w wyborze i wykonaniu serologicznych badań laboratoryjnych oraz podczas interpretacji ich wyników. Na przydatność badań serologicznych w diagnostyce bakteryjnych zakażeń człowieka wpływ ma wiele czynników, takich jak rodzaj patogenu, kliniczny przebieg choroby, swoistość i czułość metody czy też okres choroby w którym uzyskano do badania próbki surowicy. Podczas interpretacji wyników badań należy brać pod uwagę klasę i poziom wykrywanych przeciwciał, możliwość wystąpienia nieswoistych reakcji krzyżowych, wiek pacjenta, przebyte szczepienia ochronne czy też ewentualne niedobory odporności.

Słowa kluczowe: badania serologiczne, zakażenia bakteryjne, interpretacja wyników badań

ABSTRACT

In this study the most common mistakes in the selection and execution of serological laboratory tests and in interpretation their results were presented. The usefulness of serological investigation in the diagnosis of bacterial infections is influenced by many factors such as the type of pathogen, the clinical course of the disease, the specificity and sensitivity of the method and the phase of disease in which the serum sample was taken. Interpretation of test results should take into account the class and level of antibodies, the possibility of non-specific cross reactions, age of the patients, protective vaccinations and immunity deficiencies.

Key words: serological investigation, bacterial infections, interpretation of results

WSTĘP

Badania serologiczne są powszechnie wykorzystywane w diagnostyce wielu chorób bakteryjnych. Stosowane metody polegają zarówno na poszukiwaniu w próbkach materiału klinicznego antygenów jak i swoistych przeciwciał. Pomimo tego, że badania serologiczne są bardzo dobrym narzędziem w rękach kompetentnych osób, to w większości przypadków są one tylko cennym uzupełnieniem badań bakteriologicznych bądź genetycznych. Zastosowanie testów serologicznych jako metody z wyboru jest uzasadnione, jeśli czynnik etiologiczny jest niemożliwy bądź trudny do wyizolowania (np. *Borrelia*, *Mycoplasma*), jest niebezpieczny dla personelu laboratorium i wymaga specjalnych zabezpieczeń (*F. tularensis*) czy też trzeba potwierdzić rozpoznanie zakażenia poprzedzającego obecną chorobę, np. reaktywne zapalenie stawów po zakażeniach jelitowych (16). W laboratoryjnej praktyce badania serologiczne wykonywane są jednak często także w przypadku zakażeń wywoływanych przez drobnoustroje, które stosunkowo łatwo jest wyizolować bądź też uzyskać ich DNA do badań genetycznych. Jest to spowodowane najczęściej brakiem dostępności w danym laboratorium metod hodowlanych bądź genetycznych. W niektórych przypadkach badania serologiczne są wykonywane z wyboru u osób, które późno zgłosiły się lekarza ze swoimi dolegliwościami. Tak często zdarza się w przypadku zakażeń wywoływanych przez pałeczki *B. pertussis*. Chory, najczęściej osoba dorosła, decyduje się na konsultację lekarską często dopiero po kilku tygodniach kaszlu, kiedy nie ma już możliwości wyizolowania drobnoustrojów ani nawet uzyskania ich DNA. W takich przypadkach, oznaczenie poziomu przeciwciał jest jedyną możliwością potwierdzenia krztuśca.

W prezentowanej pracy podjęto próbę scharakteryzowania, w praktycznym ujęciu, najczęstszych błędów popełnianych w wyborze i wykonaniu serologicznych badań laboratoryjnych oraz w interpretacji ich wyników. Omawiana tematyka, w ograniczonej formie, była przedmiotem prezentacji ustnej na XXVIII Zjeździe PTM w Bydgoszczy w 2016 roku (13).

W JAKICH PRZYPADKACH MOŻNA WYKONYWAĆ BADANIA SEROLOGICZNE

Nie we wszystkich przypadkach zakażeń bakteryjnych można poszukiwać w surowicy chorego swoistych przeciwciał. Można oczekiwać, że badania serologiczne będą wykazywały przydatność diagnostyczną, gdy:

1. Antygen będzie na tyle dobrym i swoistym immunogenem, by w przebiegu choroby stymulować wytwarzanie swoistych przeciwciał wykrywanych *in vitro*.

Prawie wszystkie białka związane z czynnikiem zakaźnym, uważane jako obce dla organizmu człowieka, posiadają silną zdolność wywoływania odpowiedzi immunologicznej. Znacznie słabszymi immunogenami są węglowodany, a w szczególności lipidy i kwasy nukleinowe. Typ odpowiedzi immunologicznej zależy od struktury molekularnej immunogenu. Antygeny T-niezależne (np. polisacharydowa otoczka bakteryjna) stymulują wytwarzanie głównie przeciwciał klasy IgM, podczas gdy antygeny T-zależne (białka) stymulują wytwarzanie wszystkich pięciu klas immunoglobulin i mogą wywoływać odpowiedź przypominającą (5).

2. Kontakt swoistego antygeny z wydolnym układem immunologicznym będzie wystarczająco długi i bliski, by doszło do stymulacji przeciwciał.

Najsilniejsza produkcja przeciwciał występuje w przypadku kiedy czynnik zakaźny (antygen) przeniknie do narządów związanych z odpowiedzią immunologiczną, takich jak śledziona, kępkę Peyera, migdałki czy węzły chłonne. Dobrym przykładem jest zakażenie pałeczkami *F. tularensis*, w przebiegu którego dochodzi do zapalenia węzłów chłonnych. Z drugiej strony, nie ma co oczekiwać silnej odpowiedzi humoralnej w przebiegu chorób przebiegających ostro ale krótko, często ograniczonych wyłącznie np. do przewodu pokarmowego.

3. Badana osoba będzie immunokompetentna.

Niedobory odporności humoralnej u ludzi są wynikiem zmniejszonego stężenia immunoglobulin w surowicy krwi. Może ono być wynikiem upośledzonej produkcji przeciwciał lub nasilonej ich utraty, jak w przypadku enteropatii przebiegających z utratą białka, zespołu nerczycowego lub rozległych oparzeń. Zmniejszenie syntezy immunoglobulin w przebiegu pierwotnych niedoborów odporności (PNO) humoralnej wiąże się z defektem samych limfocytów B lub zaburzoną interakcją pomiędzy limfocytami B i T. Wtórne zahamowanie syntezy immunoglobulin może być wynikiem działania leków immunosupresyjnych, chorób nowotworowych lub innych przewlekłych chorób mogących wywołać supresję szpiku kostnego (1, 6). Trzeba również pamiętać, o słabszej odpowiedzi humoralnej u małych dzieci i u osób w podeszłym wieku,

4. Poziom i rodzaj swoistych wyprodukowanych przeciwciał w przebiegu choroby jest w istotnym stopniu wyższy od wykrywanego u zdrowych ludzi w danej populacji (znamiennie wyższy od tła immunologicznego).

Jednym z najważniejszych wyzwań podczas interpretacji wyników badań serologicznych jest określenie poziomu przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamienny. Określenie tego poziomu utrudnia fakt obecności przeciwciał u osób w danej populacji, związany zarówno z występowaniem nieswoistych reakcji krzyżowych, przeciwciał po przebytych bezobjawowym zakażeniu czy też przeciwciał poszczepleniowych.

Krzyżowe, nieswoiste reakcje krzyżowe wynikają z podobieństwa budowy antygenowej różnych drobnoustrojów. Szczególnie często, z racji swojej budowy, wykrywane są nieswoiste przeciwciała klasy IgM. Tak więc, bardzo istotne jest użycie w badaniach serologicznych antygenów swoistych wyłącznie dla danego patogenu. Uzyskanie takiego antygeny jest jednak trudne i wymaga z reguły zastosowania technik inżynierii genetycznej. Trzeba mieć jednak na uwadze, że tak uzyskane rekombinowane białko jest co prawda zazwyczaj wysoce swoiste, ale często nie reaguje wystarczająco silnie z poszukiwanymi przeciwciałami.

Poziom wytwarzanych przeciwciał nie zawsze koreluje z nasileniem objawów klinicznych. U osób zakażonych, u których nie doszło do wystąpienia objawów klinicznych, może dojść do produkcji wysokiego poziomu swoistych przeciwciał. Co więcej, przeciwciała te, zwłaszcza klasy IgG, mogą być obecne we krwi przez wiele miesięcy czy nawet lat. Szczególnie istotne jest to przy zakażeniach występujących często w danej populacji, np. salmonelozie. Powoduje to wysoki poziom tła immunologicznego, który utrudnia pra-

widłową interpretację wyników uzyskanych od osoby z aktualnym zakażeniem. Problemów takich zazwyczaj nie ma w przypadku chorób występujących rzadko (np. tularemia), kiedy możemy bardzo łatwo odróżnić poziom przeciwciał u osób zdrowych i chorych.

Szczególnie istotnym problemem podczas interpretacji wyników badań serologicznych jest wykrywanie przeciwciał poszczepiennych, które bardzo trudno odróżnić od przeciwciał wyprodukowanych podczas choroby. Może to prowadzić do wydawania wyników fałszywie dodatnich, zwłaszcza w przypadku badania próbek uzyskanych od osób niedawno szczepionych. Klasycznym przykładem takich problemów jest serologiczne badanie próbek uzyskanych od dzieci w kierunku obecności przeciwciał dla pałeczek krztuśca. W tym miejscu należy dodać, że badanie poszczepiennych przeciwciał u dzieci, przeważnie w kierunku tężca i błonicy, może być przydatnym narzędziem w ocenie stanu układu odpornościowego i diagnostyce niedoborów odporności.

Biorąc pod uwagę czynniki wymienione powyżej, należy zadać pytanie: Jaki poziom przeciwciał należy przyjąć za wynik dodatni w badaniach serologicznych ?

W diagnostyce serologicznej funkcjonuje termin diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał, określany czasami jako poziom odcięcia (tzw. cut-off). W praktyce, określa się go najczęściej na podstawie badania surowicy kontrolnej cut-off, dołączonej przez producenta do danego zestawu ELISA. Wielkość wartości cut-off oblicza się zazwyczaj ze średniej (arytmetycznej bądź geometrycznej) wartości poziomu przeciwciał oznaczonych w próbkach surowicy osób klinicznie zdrowych, powiększonej o 2 lub 3 odchylenia standardowe. Wartość cut off jest wygodnym w użyciu kryterium, który stosuje się przy badaniu jednokrotnie uzyskanej w przebiegu choroby próbki surowicy. Trzeba jednakże pamiętać, że wiarygodność poziomu cut-off ma krytyczne znaczenie dla czułości i swoistości odczynu serologicznego. W przypadku zaniżenia tej wartości zwiększamy czułość testu a obniżamy swoistość, natomiast przy jej zawyżeniu mamy sytuację odwrotną. Tak więc, mając na uwadze występowanie nieswoistych reakcji krzyżowych, różnice w intensywności odpowiedzi humoralnej u poszczególnych osób oraz wysokiego czasami tła immunologicznego w danej populacji, ustalenie właściwej, uniwersalnej dla różnych populacji wartości cut-off może być bardzo trudne. Dobrym tego przykładem mogą być różnice w sugerowanych wartościach cut-off przeciwciał klasy IgG w przypadku serodiagnostyki krztuśca, wahające się, w zależności od kraju i grupy badawczej, od 40 IU/ml do nawet 200 IU/ml (2). Wynika z tego, że w wykorzystywanych powszechnie komercyjnych zestawach ELISA, ustalona przez producenta wartość surowicy cut off nie zawsze musi być adekwatna do wartości cut off wyliczonej na podstawie badania próbek uzyskanych od osób zdrowych z danej populacji (10). Co za tym idzie, przed poprawnym, wcześniejszym zwalidowaniem testu, uzyskiwane wyniki w komercyjnych zestawach diagnostycznych nie mogą być w każdym przypadku brane jako pewnik i bezkrytycznie interpretowane zgodnie ze wskazówkami producenta.

Z powodu trudności z ustaleniem wartości cut-off, za bardziej miarodajne kryterium występowania aktualnego zakażenia przyjmuje się wykazanie diagnostycznie znamiennej dynamiki przeciwciał, za którą uważa się czterokrotny wzrost lub spadek miana przeciwciał w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby. Ta klasyczna zasada odnosi się jednak do przypadków, kiedy wykonujemy kolejne, zazwyczaj dwukrotne rozcieńczenia badanej próbki surowicy, np. w aglutynacji próbowkowej. Miano przeciwciał definiuje się wtedy jako odwrotność najwyższego rozcieńczenia surowicy, przy którym zachodzi jeszcze widoczna reakcja z antygenem. Aktualnie, w badaniach wykonywanych odczy-

nem immunoenzymatycznym ELISA, posługujemy się najczęściej jednym rozcieńczeniem próbki surowicy. W takim przypadku nie możemy mówić o mianie przeciwciał, lecz jedynie o poziomie przeciwciał (wyrażonym w konkretnych jednostkach) przy danym rozcieńczeniu próbki surowicy. Z powodu zastosowania jednego rozcieńczenia badanej próbki oraz ograniczeń spektrofotometrycznych czytnika ELISA rzadko mamy do czynienia z czterokrotnymi różnicami w wartości poziomu przeciwciał w kolejnych dwóch próbkach surowicy. Z tego powodu, według ECDC, w serodiagnostyce krztuśca za diagnostycznie znamiennej dynamikę przeciwciał w odczynie ELISA należy przyjąć 100% wzrost lub 50% spadek poziomu przeciwciał w dwóch, kolejnych próbkach surowicy uzyskanych w odstępie 2-4 tygodni (2).

Wykazanie diagnostycznie znamiennej dynamiki przeciwciał jest najlepszym dowodem aktualnego zakażenia. Oczywiście, żeby wykazać dynamikę konieczne jest uzyskanie co najmniej dwóch próbek surowicy w różnych okresach choroby. Niestety w praktyce, głównie ze względów ekonomicznych, tylko od niewielkiego odsetka chorych osób uzyskuje się więcej niż jedną próbkę surowicy. Istotnym ograniczeniem zastosowania tego kryterium jest również konieczność czekania 2-3 tygodni na drugą próbkę, co w oczywisty sposób opóźnia wydanie końcowego wyniku. Innym, istotnym czynnikiem wpływającym na wiarygodność tego kryterium jest okres choroby, w którym uzyskano do badania próbkę surowicy. Żeby wykazać znamienny wzrost poziomu przeciwciał, pierwszą próbkę należy pobrać w ciągu kilku dni od początku objawów klinicznych, kiedy nie narósł jeszcze wysoki poziom przeciwciał, kolejną zaś próbkę w szczycie odpowiedzi humoralnej, zazwyczaj 2-3 tygodnie od początku choroby. W praktyce, rzadko kiedy pierwsza próbka uzyskiwana jest w tak wczesnym okresie choroby. Zazwyczaj do laboratorium trafia próbka surowicy uzyskana po wielu dniach trwania choroby, kiedy doszło już do wytworzenia wysokiego poziomu przeciwciał. Oczywiście, w drugiej próbce, uzyskanej po kolejnych 2-3 tygodniach nie ma się już co spodziewać diagnostycznie znamiennej przyrostu przeciwciał. Często wtedy mamy już do czynienia ze spadkiem tego poziomu, aczkolwiek w wielu przypadkach bardzo powolnym.

W przypadku niektórych chorób, oprócz poszukiwania swoistych przeciwciał w surowicy krwi, można poszukiwać także obecności swoistych antygenów w różnorodnych próbkach materiału klinicznego. Przykładowo, w serodiagnostyce legionelozy w późniejszym okresie choroby, poszukuje się zazwyczaj przeciwciał klasy IgA, IgG lub IgM. Znacznie bardziej wiarygodne, zwłaszcza w kilku pierwszych tygodniach choroby, jest jednak poszukiwanie odczynem ELISA bądź metodą immunochromatografii, swoistych antygenów w moczu chorych osób (14). Tak więc, przy wyborze konkretnej metody w tym przypadku decyduje okres choroby, w którym znajduje się badany pacjent.

NAJCZĘSTSZE BŁĘDY W WYBORZE, WYKONANIU I INTERPRETACJI WYNIKÓW BADAŃ SEROLOGICZNYCH

Błąd laboratoryjny to każdy błąd popełniony na drodze od przygotowania zlecenia, badania do raportowania i interpretacji jego wyniku, a także podjętych na tej podstawie działań. Błędy dzielą się na te popełniane w fazie przedanalizycznej, analitycznej i poanalizycznej (4, 15). Nie wnikając w szczegółowy podział błędów popełnianych podczas wykonywania badań serologicznych poniżej zestawiono, w praktycznym ujęciu, najczęstsze przyczyny nieprawidłowości związanych z serologiczną diagnostyką bakteryjnych zakażeń człowieka.

1. Badanie próbek niewłaściwych, źle pobranych, nieprawidłowo transportowanych lub uzyskanych w zbyt wczesnej lub zbyt późnej fazie choroby.

Krew do badań serologicznych powinna być pobrana od badanej osoby na czczo lub 2-4 godzin po lekkim posiłku, przy zachowaniu dotychczasowej diety. Krew należy pobierać jałowo na skrzep w objętości nie mniejszej niż 2 ml. Próbkę krwi powinna być przetransportowana do laboratorium w jałowej, szczelnie zamkniętej probówce w temperaturze otoczenia w czasie nie dłuższym niż 4 godziny od pobrania lub w ciągu 24 godzin przy zachowaniu temperatury 5°C (\pm 3°C). W przypadku próbki surowicy czas transportu może być odpowiednio dłuższy, trzeba natomiast pamiętać, że jeśli próbka surowicy będzie przechowywana lub transportowana w czasie dłuższym niż 5 dni, należy ją zamrozić w temperaturze poniżej -20°C. Próbkę surowicy powinna być klarowna, przezroczysta lub lekko opalizująca. Surowica, która uległa silnej hemolizie nie może być przeznaczona do badania.

W interpretacji wyników badań serologicznych uwzględnić należy kinetykę przeciwciał należących do poszczególnych klas (3). Jako pierwsze, już po kilku dniach od początku objawów klinicznych, pojawiają się w surowicy osób chorych swoiste przeciwciała klasy IgM, następnie klasy IgA oraz nieco później, przeciwciała klasy IgG. Trudno jest określić natomiast jednoznacznie czas utrzymywania się przeciwciał po przebytej chorobie, który zależy od wieku chorego, stanu jego układu odpornościowego, rodzaju patogenu i drogi zakażenia, zespołu objawów klinicznych oraz tego czy był to pierwszy czy kolejny kontakt chorego z danym zarazkiem. Czas ten może wahać się od kilku tygodni do wielu lat, zwłaszcza w przypadku przeciwciał klasy IgG. Tak więc, w próbce pobranej zbyt wcześnie nie wykryjemy jeszcze obecności przeciwciał klasy IgG, natomiast pobranej zbyt późno nie stwierdzimy przeciwciał klasy IgM czy też IgA. Z tego względu, w większości przypadków, celowe jest oznaczanie w próbce surowicy jednocześnie wszystkich trzech klas immunoglobulin. Jak już wspomniano wcześniej, w celu wykazania serokonwersji, za optymalne uważa się uzyskanie pierwszej próbki surowicy jak najszybciej po wystąpieniu objawów klinicznych, zaś drugiej po kolejnych 2-3 tygodniach choroby. W przypadku jednokrotnego badania, w celu uniknięcia wyniku fałszywie ujemnego, próbka krwi do badań nie powinna być pobierana w zbyt wczesnej fazie choroby (17). W przypadku niektórych chorób bakteryjnych, pierwszą próbkę do badań serologicznych można pobrać już po tygodniu od początku objawów klinicznych. Przy innych, np. boreliozie, zaleca się wykonanie pierwszego badania u pacjenta po upływie dopiero 3-4 tygodni od ekspozycji na kleszcza (18). Trzeba pamiętać, że uzyskanie wyniku wątpliwego w pierwszej próbce surowicy, zwłaszcza w klasie IgM, jest bezwzględny wskazaniem do badania drugiej próbki.

Z powodu długiego utrzymywania się w niektórych przypadkach wysokiego poziomu przeciwciał po przebytej chorobie, istnieje niebezpieczeństwo błędnej interpretacji obecności tych przeciwciał w surowicy za objaw aktualnego zakażenia. W takim przypadku lekarz najczęściej nie zleca już wykonania badań w kierunku innych chorób zakaźnych, co może prowadzić do niewykrycia faktycznej przyczyny choroby. Problem ten najczęściej występuje, gdy w badanej próbce surowicy poszukuje się jedynie przeciwciał klasy IgG, które szczególnie długo utrzymują się na podwyższonym poziomie. Przydatne w takich przypadkach może być oznaczenie przeciwciał klasy IgM i IgA a jeszcze lepiej, zbadanie kolejnej próbki surowicy, uzyskanej po kilku tygodniach i określenie indeksu przeciwciał IgM/IgG. Wraz z upływającym czasem, poziom przeciwciał klasy IgM opada szybciej niż przeciwciał klasy IgG, co prowadzi do spadku wartości indeksu. I tak, przykładowo w przebiegu mykopłazmozy średnia war-

tość indeksu IgM/IgG w pierwszym tygodniu choroby wynosiła 1,5, w drugim tygodniu 3,6, a następnie stopniowo spadała do wartości 1,8 w 8. tygodniu i 1,4 w surowicach uzyskanych w 9-16. tygodniu choroby (7). Trzeba mieć świadomość, że w niektórych przypadkach chorobowych podwyższony poziom przeciwciał klasy IgM utrzymuje się przez wiele miesięcy, tak więc wykazanie obecności tych przeciwciał nie zawsze musi dowodem aktualnego zakażenia.

3. Zastosowanie niewłaściwej techniki badań bądź nieswoistego antygeny.

Podstawą prawidłowo prowadzonej serologicznej diagnostyki jest zastosowanie testu o wysokiej czułości i swoistości. Aktualnie w serodiagnostyce zakażeń bakteryjnych najczęściej używa się bardzo czułego odczynu immunoenzymatycznego ELISA, który umożliwia ilościowe oznaczenie poziomu przeciwciał w poszczególnych klasach immunoglobulin. Jako test potwierdzenia stosuje się niekiedy odczyn western-immunoblotting, dzięki któremu możliwe jest wykrycie w badanej próbce surowicy obecności przeciwciał dla poszczególnych, wysoce swoistych dla danego patogenu, antygenów białkowych. Metody te wyparły klasyczne metody serologiczne, takie jak odczyn aglutynacji probówkowej, test zahamowania hemaglutynacji czy odczyn wiązania dopełniacza, w których wykrywano głównie przeciwciała klasy IgM. Trzeba pamiętać, że wyniki dodatnie uzyskane w testach przeglądowych (screeningowych), powinny być potwierdzane bardziej swoistymi testami, opartymi głównie o rekombinowane białka (12).

Swoistość wyników uzyskanych w badaniu serologicznym zależy od swoistości zastosowanego w danej metodzie antygeny. Antygenami w odczynach serologicznych najczęściej są białka i lipopolisacharydy (LPS), przy czym swoistość tych ostatnich jest dość ograniczona. Przykładem jednoczesnego zastosowania białek i LPS jako antygenów w odczynie ELISA jest serodiagnostyka jersiniozy prowadzona od wielu lat w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH. Zastosowanie antygeny białek wydzielniczych Yop, charakterystycznych dla wszystkich patogennych pałeczek *Yersinia*, zapewnia wysoką swoistość odczynu, natomiast użycie LPS uzyskanych z pałeczek należących do poszczególnych serotypów pałeczek *Yersinia* umożliwia rozróżnienie gatunku i grupy serologicznej drobnoustrojów odpowiedzialnych za wywołanie zakażenia (8). Coraz częściej w serodiagnostyce chorób zakaźnych jako wysoce swoistych antygenów używa się rekombinowanych białek uzyskanych metodami inżynierii genetycznej. Dobrym przykładem takiego antygeny jest rekombinowane białko P1 charakterystyczne dla *M. pneumoniae* (9). Trzeba mieć jednak na uwadze, że nie ma antygenów całkowicie swoistych i zawsze mogą wystąpić nieswoiste reakcje krzyżowe, wynikające z przypadkowego podobieństwa budowy antygenowej.

4. Nieprzestrzeganie procedury badań oraz błędy w organizacji pracowni serologicznej.

Są to częste błędy związane z brakiem zachowania należytej staranności podczas wykonywania badań, czy też ogólnie, z nieodpowiednią organizacją pracy w laboratorium serologicznym. Każde badanie serologiczne musi być przeprowadzone ściśle według instrukcji producenta, z zachowaniem odpowiedniego czasu inkubacji, temperatury, długości fali w czytniku spektrofotometrycznym, użyciem nieprzeterminowanych odczynników, itd. Test ELISA jest bardzo czuły nawet na niewielkie odstępstwa i błędy techniczne. Szczególnie niebezpieczeństwo związane jest z użyciem przeterminowanego lub zmienio-

nego (utlenionego) koniugatu i chromogenu czy też z niedokładnościami podczas płukania dołków płytki metapleksowej. Niezwykle istotne jest zachowanie dokładności i powtarzalności podczas wykonywania badań w kolejnych seriach (dniach).

W celu zminimalizowania błędów podczas wykonywania badań serologicznych należy bezwzględnie przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. W laboratorium powinien być wdrożony system jakości, a wszystkie czynności, od pobrania próbki krwi po wydanie końcowego wyniku, powinny być opisane w odpowiednich instrukcjach czy procedurach i podlegać stałej kontroli.

5. Badanie próbki surowicy diagnostycznej oraz próbek kontrolnych (w tym przede wszystkim próbki cut-off) tylko w jednym dołku płytki do odczynu ELISA.

Trzeba pamiętać, żeby w każdej serii badań serologicznych, prowadzonych szczególnie tak czułym odczynem jak test ELISA, stosować surowice kontrolne. Absolutne minimum to zastosowanie surowicy cut off, surowicy kontrolnej dodatniej i surowicy kontrolnej ujemnej. Szczególnie ważna jest surowica cut off, której wartość ma zasadnicze znaczenie w uzyskaniu wiarygodnych wyników badań serologicznych. Z tego powodu, surowica cut off powinna być badana co najmniej w dwóch dołkach płytki, w celu wykluczenia przypadkowych błędów technicznych (np. niedopłukania dołka). Co więcej, z tego samego powodu, dobrą praktyką laboratoryjną powinno być badanie każdej surowicy diagnostycznej i kontrolnej w powtórzeniu, tj. w dwóch dołkach płytki metapleksowej.

6. Czynniki interferujące w diagnostyce serologicznej - pominięcie etapu absorpcji z surowic czynnika reumatoidalnego w przypadku oznaczania przeciwciał klasy IgM.

Czynnik reumatoidalny (rheumatoid factor, RF) jest to autoprzeciwciało skierowane przeciwko domenom CH2 i CH3 regionu Fc immunoglobuliny klasy G. Najczęściej (w 85%) występuje w klasie IgM, ale może też występować jako przeciwciało w klasie IgG, IgA lub IgE, jednak RF w innych klasach niż IgM nie ma znaczenia diagnostycznego. RF występuje u około 80% pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, a także w przypadku innych chorób reumatycznych. Obecny w surowicy osoby badanej czynnik RF może reagować z przeciwciałami klasy IgG związanymi na płycie z antygenem. W takim przypadku może dojść do fałszywie dodatnich wyników w klasie IgM (koniugat będzie łączył się z czynnikiem RF i dawał reakcje barwne nawet przy całkowitym braku swoistych przeciwciał klasy IgM). W celu uniknięcia tych nieswoistych reakcji w przypadku oznaczania przeciwciał klasy IgM, powinno się wstępnie absorbować czynnik reumatoidalny z surowicy osoby badanej. Czasami również istnieje możliwość zastąpienia (blokowania) przeciwciał IgM, słabo wiążących się z antygenem, przez silniej wiążące przeciwciała IgG obecne w surowicy w wysokim poziomie, skutkujące wynikami fałszywie ujemnymi w klasie IgM. Z tego powodu, najlepiej podczas oznaczania przeciwciał klasy IgM, całkowicie usunąć z próbki surowicy przeciwciała klasy IgG.

Z innych czynników interferujących w badaniach serologicznych należy wymienić:

- jony żelaza (hemoglobina) – utleniające substraty dla peroksydazy, co może być przyczyną nieswoistych oznaczeń
- zabarwienie próbki (szczególnie PMR) – hemoliza uniemożliwia prawidłową interpretację wyniku, wskazane powtórne pobranie materiału od chorego

- hiperglikemię
- zanieczyszczenia bakteryjne, które powodują albo nieswoisty dodatni wynik poprzez wiązanie koniugatu albo degradują przeciwciała będąc przyczyną fałszywie ujemnych wyników
- wielokrotne zamrażanie i odmrażanie próbki surowicy.

Szczególnie ciekawy jest ostatni punkt z wymienionej powyżej listy. W instrukcji wykonywania testów ELISA istnieje zazwyczaj uwaga, żeby próbki surowicy nie poddawać wielokrotnym cyklom zamrażania i odmrażania. Wyniki przeprowadzonych badań nie wykazały jednak istotnych różnic w poziomie przeciwciał w wielokrotnie zamrażanych próbkach surowicy (11).

8. Brak standaryzacji metodyki odczynu oraz brak kontroli jakości (wewnątrz i zewnątrz laboratoryjnej).

Badania serologiczne powinny być poddawane wewnątrz- i zewnątrz laboratoryjnej kontroli jakości. Trzeba mieć jednak na uwadze, że na rynku dostępnych jest wiele komercyjnych testów serologicznych różnych firm. Ze względu na zastosowane w nich różne preparaty antygenowe oraz różne poziomy odcięcia (cut off) wyniki uzyskane podczas badania tej samej próbki surowicy mogą się różnić. Aby zminimalizować ryzyko otrzymania wyniku fałszywego, należy wybierać optymalne, dostosowane do populacji i regionu geograficznego testy, które powinny być dobrze wystandaryzowane przez producenta.

9. Brak uwzględnienia w interpretacji wyników badań serologicznych wieku pacjenta, wywiadu lekarskiego, zespołu objawów klinicznych, szczepień, wyników innych badań laboratoryjnych.

U niemowląt mogą być obecne matczyne przeciwciała IgG przekazane przezłożyskowo, których poziom zależy od ich stężenia u matki i efektywności przekazywania przez łożysko. Ich duże stężenie utrudnia diagnostykę serologiczną w pierwszych miesiącach życia oraz może powodować supresję wytwarzania swoistych przeciwciał IgM u dziecka. Ze względu na niedojrzały układ immunologiczny u małych dzieci poziom przeciwciał, zwłaszcza klasy IgA, w przebiegu choroby będzie niższy niż u osób dorosłych. Może to skutkować uzyskaniem wyników fałszywie ujemnych. Z taką sytuacją spotykamy się np. podczas serodiagnostyki krztuśca. U szczepionych dzieci, z powodu podwyższonego poziomu poszczepiennych przeciwciał klasy IgM i IgG, najlepszym swoistym markerem aktualnego zakażenia pałeczką *B. pertussis* jest wykazanie znamiennej diagnostycznego poziomu immunoglobulin klasy A. Niestety, słaba produkcja przeciwciał klasy IgA u małych dzieci może być przyczyną niskiej czułości badań serologicznych przy poszukiwaniu tej klasy immunoglobulin. Z tego względu badania serologiczne w kierunku krztuśca nie są zalecane jako test z wyboru u szczepionych, małych dzieci. Znacznie lepiej nadają się do tego badania PCR.

10. Stawianie rozpoznania choroby wyłącznie na podstawie wyników badań serologicznych, przeprowadzonych zwłaszcza jednokrotnie, często bez wskazań klinicznych.

Uwaga ta skierowana jest do lekarzy, do których należy postawienie końcowej diagnozy. Trzeba pamiętać, że uzyskanie dodatnich wyników badań serologicznych w kierunku

chorób bakteryjnych, nawet prawidłowo przeprowadzonych, nie jest bezwzględnym wskazaniem do podjęcia leczenia, w tym przede wszystkim do antybiotykoterapii. Wiedza i doświadczenie lekarza mają najważniejsze znaczenie w postawieniu właściwego rozpoznania choroby na podstawie wyników badań laboratoryjnych, zespołu objawów klinicznych, danych z wywiadu czy też innych badań. Lekarz powinien interpretować wynik badań serologicznych w odniesieniu do konkretnego przypadku chorobowego u konkretnego pacjenta. Z tego względu, pracownik laboratorium mikrobiologicznego – diagnosta laboratoryjny, nie może stawiać rozpoznania choroby zakaźnej na podstawie uzyskanych wyników badań serologicznych. Może natomiast i powinien pomóc lekarzowi w prawidłowej interpretacji tych wyników. Brak współpracy pomiędzy lekarzem a diagnostą laboratoryjnym może prowadzić do błędów w interpretacji uzyskanych wyników oraz do leczenia pacjentów jedynie na podstawie wyników badań serologicznych, często bez wskazań klinicznych. Czasami też, po przeleczeniu pacjenta antybiotykiem, lekarze oczekują w każdym przypadku natychmiastowego spadku poziomu przeciwciał, co miałyby być oznaką wyleczenia z choroby zakaźnej. Zapominają przy tym, że tempo spadku poziomu już wytworzonych przeciwciał uzależnione jest od ich naturalnego czasu rozkładu nie zaś od zastosowanego antybiotyku.

Na zakończenie należy przypomnieć, że zgodnie z obowiązującym prawem laboratoria mają obowiązek zgłaszania dodatnich wyników badań w kierunku wybranych chorób zakaźnych, w tym również wyników badań serologicznych. Dbając o rzetelność tych zgłoszeń, wypada zadać pytanie, jakie kryteria przyjmują laboratoria zgłaszając przypadki serologicznego potwierdzenia choroby zakaźnej? Brak jednoznacznych wytycznych powoduje, że może zaistnieć w praktyce sytuacja, że jedne laboratoria zgłaszają wykrycie przeciwciał wyłącznie klasy IgA, a inne klasy IgG bądź IgM. Jest to o tyle istotne, że w obowiązującym formularzu zgłoszenia dodatniego wyniku badania w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych, laboratoria nie podają ani klasy ani poziomu przeciwciał wykrytych w próbce surowicy osoby chorej. Uniemożliwia to, lub co najmniej utrudnia, weryfikację tych zgłoszeń przez osoby zatrudnione w Powiatowych Stacjach Sanitarno-Epidemiologicznych. Nie wnikając w szczegóły, ważne jest aby podejść do tego tematu rozsądnie, kierując się własnym doświadczeniem, biorąc pod uwagę zarówno klasę jak i poziom wykrywanych przeciwciał oraz przede wszystkim znając ograniczenia testu, którym wykonywano serologiczne badania.

PIŚMIENNICTWO

1. *Celińska-Löwenhoff M, Musiał J.* Niedobory odporności humoralnej u osób dorosłych. *Alergia Astma Immunologia* 2014; 19: 202-9.
2. *Guiso, Berbers G, Fry NK i inni.* What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011; 30: 307-12.
3. *James K.* Immunoserology of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 132-52.
4. *Kulpa JK.* Ryzyko błędów w fazie przed-analitycznej Jan Kanty Kulpa Zakład Analityki i Biochemii Klinicznej Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie Oddział w Krakowie. www.katowice.uw.gov.pl/download/25366.pdf
5. *Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.* Mikrobiologia. 2009 Philadelphia, Pennsylvania.

6. Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A i inni. Primary immunodeficiency diseases: an upadate. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 677-87.
7. Rastawicki W. Ocena odczynami tradycyjnymi i nowej generacji odpowiedzi humoralnej na antygeny *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu naturalnego zakażenia u ludzi. Praca doktorska, PZH, Warszawa, 1994.
8. Rastawicki W. Humoralna odpowiedź na wybrane antygeny pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* w przebiegu jersiniozy u ludzi. IV. Ocena swoistości antygenów. Med Dośw Mikrobiol 2008; 57: 27- 37.
9. Rastawicki W, Rokosz N, Gierczyński R, Jagielski M. Zastosowanie metody inżynierii genetycznej do uzyskania białka P1 *Mycoplasma pneumoniae* oraz ocena jego przydatności w serodiagnostyce mykoplazmozy u ludzi. Med Dośw Mikrobiol 2012; 64: 229-37.
10. Rastawicki W, Paradowska-Stankiewicz I, Stefanoff P, Zasada AA. Ocena wiarygodności poziomu przeciwciał przyjmowanego za diagnostycznie znamienne w serodiagnostyce krztuśca wykonywanej odczynem ELISA. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 73-80.
11. Rastawicki W, Śmietalska K, Rokosz N, Jagielski M. Wpływ wielokrotnego, cyklicznego zamrażania i rozmrażania próbki surowicy na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla wybranych antygenów bakteryjnych. Med Dośw Mikrobiol 2012; 64: 79-85.
12. Rastawicki W, Chróst A, Gielarowiec K. Development and evaluation of latex agglutination tests for the detection of human antibodies to the lipopolysaccharides of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) serogroups O157 and non-O157. J Microbiol Method 2017; 140: 74-6.
13. Rastawicki W. Serologiczna diagnostyka zakażeń człowieka – jakie błędy popełniane są w wyborze i wykonaniu badań laboratoryjnych oraz w interpretacji ich wyników. Materiały Zjazdowe XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Bydgoszcz, 25-27 września 2016 r.
14. Rokosz N, Rastawicki W, Zasada AA, Baczeńska-Rej M. Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń układu oddechowego wywołanych przez pałeczki *Legionella pneumophila*. Pneumonol Alergol Pol. 2010; 78: 54-9.
15. Szutowicz A, Raszei-Specht A. Diagnostyka laboratoryjna. Gdański Uniwersytet Medyczny. Gdańsk 2009, Tom 1.
16. Tuuminen T, Lounamo K, Leirisalo-Repo M. A review of serological tests to assist diagnosis of reactive arthritis: critical appraisal on methodologies. Frontiers in Immunol 2013; 4: 1-6.
17. Wain J, Hosoglu S. The laboratory diagnosis of enteric fever. J Infect Dev Count 2008; 2: 421-5.
18. Wojciechowska-Koszko I, Mnichowska-Polanowska M. Serologiczna diagnostyka boreliozy z Lyme w praktyce laboratoryjnej. Post Mikrobiol 2015; 54: 283-90.

Otrzymano: 19 X 2017 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW



Konferencja pod patronatem PTM

IV edycja konferencji
„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”
Wrocław, 24 listopada 2017

Szanowni Państwo,

Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego zapraszają na IV edycję konferencji pt. *„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”*.

Konferencja ma na celu prezentację badań z zakresu mikrobiologii i parazytologii jakie są prowadzone aktualnie w krajowych jak i zagranicznych jednostkach naukowych. Pragniemy również udokumentować historyczny dorobek polskich naukowców w tych dziedzinach. W tym roku szczególną uwagę objęty będzie problem uwarunkowanych środowiskowo chorób infekcyjnych i inwazyjnych, których czynnikami etiologicznymi są patogeny transmitowane przez stawonogi (wektory), głównie hematofagiczne kleszcze i komary, a także ukazanie skutecznych sposobów zapobiegania i monitorowania tych zagrożeń.

Podczas konferencji planowana jest prezentacja praktycznych osiągnięć 20-letniej współpracy Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UWr z Wydziałem Środowiska i Rolnictwa Urzędu Miasta Wrocławia w zakresie biologicznego (mikrobiologicznego) zwalczania komarów na terenie Aglomeracji Wrocławskiej. Ważnym celem konferencji jest także integracja środowiska naukowego oraz ukazanie osiągnięć naukowych młodych adeptów nauki.

Szczegółowe informacje zamieszczone są na stronie:

<http://www.mikrobiologia.uni.wroc.pl>

Organizator: Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Miejsce: Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii

ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław



Konferencja pod patronatem PTM

V edycja konferencji **Viruses of Microbes V: Biodiversity and future applications** Wrocław, 9-13 lipca 2018

Jest to piąte już spotkanie z serii międzynarodowych konferencji towarzystwa International Society for Virus of Microbes (ISVM) poświęconej wirusom drobnoustrojów.

Konferencje Virus of Microbes odbywają się co dwa lata, a rozpoczęły się w 2010 roku w Instytucie Ludwika Pasteura w Paryżu, a następnie kontynuowane były w Brukseli (2012), Zurichu (2014), i Liverpoolu (2016), gromadząc na każdym spotkaniu ok. 400-500 uczestników z całego świata.

Przyszłoroczne spotkanie zatytułowane jest „Biodiversity and future application”. Tematyka pięciodniowej konferencji poświęcona będzie podstawowym i aplikacyjnym badaniom naukowym nad wirusami mikroorganizmów (algi, archaea, bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy). Wirusy są kluczowym elementem warunkującym bioróżnorodność i ewolucję mikrobiologiczną, jak również służą jako narzędzie w biologii molekularnej. W ostatnich czasie coraz większym zainteresowaniem cieszą się badania nad bakteriofagami, które stanowią obiecującą alternatywę leczenia infekcji wywołanych zwłaszcza przez wielolekooporne szczepy patogenów człowieka, a są stosowane już w konserwacji żywności, hodowli zwierząt i produkcji roślin uprawnych.

Uniwersytet Wrocławski (prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa) wraz z Laboratorium Bakteriofagowym Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu (prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska), mają zaszczyt organizować kolejną międzynarodową edycję tej konferencji w 2018 roku.

Konferencja porusza tematykę niezwykle aktualną i będzie dedykowana do wszystkich osób zajmujących się zagadnieniami z zakresu zwalczania zakażeń bakteryjnych, jak również ekologii i różnorodności biologicznej drobnoustrojów.

Konferencja została objęta patronatem przez European Molecular Biology Organization jako EMBO Workshop „Viruses of microbes 2018” <http://www.embo.org/events>

Lokalizacja:

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii, ul. Uniwersytecka 22/26, 50-145 Wrocław

Organizatorzy:

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Kontakt:

prof. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu.pl, tel. 71 375 62 90

prof. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72 wewn. 316

VIRUSES OF MICROBES V
Biodiversity and future applications
9 – 13 July 2018 Wrocław, Poland

Institute of Genetics and Microbiology
University of Wrocław
&
Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy
Polish Academy of Sciences

On behalf of the organising committee of the ISVM conference on the Viruses of Microbes, we are pleased to invite to the fifth meeting in an international series that began in 2010 at the Pasteur Institute.

This event is one that focuses on basic and applied scientific research on viruses infecting microbes (algae, archaea, bacteria, fungi, protozoa and viruses). Viruses have always been a key element of microbial diversity and evolution, as well as a tool for the molecular biologist to learn more about how the host cell functions, but this information has also been put to productive use in latter days to control infections and fouling in many areas of our modern life.

The conference is included to the EMBO Workshop list <http://www.embo.org/events>

Location:

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii
ul. Uniwersytecka 22/26, 50-145 Wrocław

Organizers:

Uniwersytet Wrocławski; Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Contact:

prof. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu.pl, tel. 71 375 62 90

prof. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72/ 316



Informacja o pracy Prezydium Zarządu Głównego PTM.

30 sierpnia, 12 września, 31 października 2017 r. odbyły się elektroniczne głosowania przez członków Prezydium ZG PTM szeregu Uchwał, które poniżej omówiono.

1) Zgłosiło się szereg kandydatów, którzy chcieliby zapisać się do PTM. Jednomyślnie przyjęto **Uchwałę nr 23-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie przyjęcia 20 nowych członków zwyczajnych PTM.**

2) Dużo wysiłku wkładamy w porządkowanie przynależności osób do PTM i kwestii opłacania przez nich składek członkowskich. Dokładna liczba członków PTM jest trudna do ustalenia, ale określamy ją na około 1000 osób. Jednakże na dzień 28.08.2017 r. składki za dany rok zapłaciło: 2015 r. – 693, 2016 r. – 760, 2017 r. – 595 osób. Zgodnie ze Statutem PTM par.15 p. 3: „Członkostwo zwyczajne ustaje na skutek skreślenia z listy członków Towarzystwa z powodu nie zapłacenia składki członkowskiej przez dwa kolejne lata, skreślenie może nastąpić dopiero po pisemnym uprzedzeniu o zamiarze skreślenia, przez Oddział Terenowy PTM i upływie wyznaczonego terminu dodatkowego do uregulowania zaległych składek”. Do osób które w przewidzianym przez Statut PTM i Uchwałę ZG PTM z dnia 04.02.2014 nie opłaciły zaległych składek członkowskich i do których mieliśmy adresy wysłano w lipcu 2017 r. listy z zawiadomieniem o planowanym skreśleniu. Część z tych osób uzupełniła składki, część przysłała listy o rezygnacji z członkostwa w PTM. Pozostają osoby, do których nie możemy dotrzeć oraz osoby nieplacące składek przez wiele lat, ale nie skreślone z listy PTM z powodu niedopatrzenia tej sprawy. Jednomyślnie przyjęto **Uchwałę nr 24-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie uporządkowania listy członków zwyczajnych PTM i usunięcia z tej listy osób nie płacących składek członkowskich w statutowo przewidzianym terminie.** Na początku września br. wysłaliśmy listy do ponad 170 osób z informacją, że zostają wykreśleni z listy członków zwyczajnych PTM. Na zaktualizowanej liście pozostaną osoby, które regularnie opłacały składki do 2014 r. i zapłaciły składki za 2015 i/lub 2016 i/lub 2017. Nie dotyczy to osób, które przystąpiły do PTM w okresie 2015-2017.

3) Brak regularnego płacenia składek członkowskich jest niewątpliwie zaniedbaniem lub świadomą decyzją tych osób, jednakże wydaje się, że w minionym okresie Towarzystwo nie wykazało należytej aktywności w przypominaniu o konieczności zapłacenia zaległych składek i wysyłaniu do dłużników e-maili i listów w tej sprawie. Wiele osób zasłużonych dla mikrobiologii zaniedbało obowiązek regularnego płacenia składek. Opinie na temat utworzenia możliwości ponownego przystąpienia do PTM osobom, skreślonym z powodu nieplacenia składek, wśród członków Prezydium były podzielone. Większość członków Prezydium była jednak za przyjęciem **Uchwały nr 25-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie możliwości ponownego przystąpienia do PTM po rocznym okresie karencji osób skreślonych z listy członków PTM za nieplacenie składek członkowskich.** Tym samym wprowadza się możliwość ponownego przystąpienia do PTM osobom skreślonym z listy członków zwyczajnych z powodu nieplacenia składek członkowskich, po rocznym okresie karencji, od 01.10.2018 r., na zasadach nowo przystępujących do Towarzystwa członków zwyczajnych.

4) Dostyc długo zajmowaliśmy się kwestią przygotowania stanowiska PTM w sprawie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego. Przy wsparciu 3-osobowego zespołu, którego prace koordynowała Pani prof. Beata Sadowska przygotowano propozycję tekstu, w którym staraliśmy się osiągnąć kompromis stanowisk. Większość członków Prezydium była za przyjęciem **Uchwały nr 26-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie stanowiska PTM odnośnie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu**

Diagnosty Laboratoryjnego. Poniżej zamieszczony jest tekst, który będzie opublikowany w czasopismach PTM oraz został przekazany do Pana Prezydenta RP Andrzeja Dudy, Pani Premier Beaty Szydło, Panów Ministrów ds. Zdrowia Konstantego Radziwiłła i ds. Nauki Jarosława Gowina. Od Pana Ministra K. Radziwiłła otrzymaliśmy odpowiedź, że prace nad ustawą są prowadzone i nasze stanowisko będzie wzięte pod uwagę.

**Stanowisko Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
w sprawie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na
kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego**

W oparciu o Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 14 listopada 2008 r. (Dz. U. Nr 208, Poz. 1312), wpisujące mikrobiologię na listę dziedzin mających zastosowanie w ochronie zdrowia oraz ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym z 2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz. 455), utworzono niezależne kierunki Mikrobiologia na wydziałach pięciu Polskich uniwersytetów posiadających odpowiednie uprawnienia (Uniwersytetu Łódzkiego, Szczecińskiego, Warmińsko-Mazurskiego, Wrocławskiego oraz Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego). Opracowano standard kształcenia dla kierunku Mikrobiologia, dokonując przesunięcia profilu kształcenia z ogólnobiologicznego w kierunku ogólnomedycznym, co wydaje się, że powinno zapewnić zdobywanie przez studentów kierunku Mikrobiologia wiedzy i umiejętności upoważniających do podejmowania samodzielnych czynności w ramach szeroko rozumianej medycznej diagnostyki laboratoryjnej. Standard ten został opracowany przez mikrobiologów, immunologów i genetyków z uniwersytetów: Łódzkiego, Warszawskiego, Wrocławskiego i UMCS w Lublinie, przy współpracy z członkami Komitetu Mikrobiologii PAN oraz w porozumieniu z Krajową Radą Diagnostów Laboratoryjnych oraz kierownikami laboratoriów medycznych, i zatwierdzony przez Radę Główną Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Na podstawie ww. znowelizowanej ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym, standard ten został przepisany na odpowiednie efekty kształcenia w zakresie wiedzy, umiejętności i kompetencji społecznych.

Podczas pięcioletnich, dwustopniowych studiów (3+2), osoby uzyskujące najpierw licencjat na kierunku Mikrobiologia, a następnie tytuł zawodowy magistra Mikrobiologii powinni uzyskać efekty kształcenia wymagane do wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 24 sierpnia 2016 r. (Poz. 1434), które mają obowiązywać od roku akademickiego 2017/2018 studentów kierunku Analityka Medyczna/Medycyna Laboratoryjna. Studenci obu stopni studiów kierunku Mikrobiologia uzyskują wszystkie wymagane tym Rozporządzeniem i weryfikowane podczas egzaminów i kolokwii zaliczeniowych, efekty kształcenia. Biorąc pod uwagę odpowiedzialność, jaka spoczywa na zawodzie Diagnosty Laboratoryjnego, wyrażamy przekonanie, iż tylko osiąganie określonych standardów/ efektów kształcenia w ramach wybranych kierunków studiów wyższych, może być gwarancją przygotowania absolwentów do pracy w tym zawodzie, zapewniając jednocześnie bezpieczeństwo pacjentów i prawidłową współpracę diagnostów z lekarzami.

W związku z powyższym większość członków Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów uważa, iż uprawnienia do tytułu Diagnosty Laboratoryjnego powinny

być uzależnione od odpowiednich efektów kształcenia, które muszą być ustalone dla każdego kierunku, a nie od nazwy kierunku studiów. Absolwenci uniwersyteckich kierunków Mikrobiologia, z tytułem magistra mikrobiologii, powinni mieć prawo do starania się o wpis na Listę Diagnostów Laboratoryjnych, ponieważ podczas studiów uzyskują efekty kształcenia wymagane do wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego, zgodne ze standardem przewidywanym dla kierunku Analityka Medyczna/Medycyna Laboratoryjna, dokumentowane dyplomem, dorobkiem (praca licencjacka, magisterska, doktorska, publikacje) oraz odbytymi praktykami i stażami zawodowymi. Prawo wpisu na Listę Diagnostów Laboratoryjnych dla absolwentów kierunku Mikrobiologia można by uzyskać po ukończeniu studiów i po rocznym stażu w wieloprofilowym laboratorium medycznym oraz zdaniu egzaminu państwowego.

5) Co roku odbywają się w różnych miastach Europy spotkania zarządu FEMS i przedstawicieli europejskich towarzystw mikrobiologicznych, tzw. FEMS Council. Zwykle jest to około 60 osób. Obrady trwają 2 dni piątek i sobotę w I połowie września. Poruszane są sprawy dotyczące FEMS, akceptowane sprawozdania, organizowane wybory członków zarządu, itp. sprawy organizacyjne. Na ubiegłorocznym spotkaniu w Atenach zapytano, czy nie można by zorganizować FEMS Council w Warszawie – nigdy nie było takiego spotkania w Polsce. Wydaje się, że wypadaloby po 43 latach takich spotkań zorganizować FEMS Council w Warszawie we wrześniu 2018 r. Przy okazji Konferencji krakowskiej zgłosiły się firmy: Global Congress sp. z o.o. oraz Warsaw Convention Bureau, które po rozmowach zaoferowały pomoc w organizacji FEMS Council oraz pewien wkład finansowy na pokrycie: cocktailu powitalnego, wycieczki po Warszawie i częściowe dofinansowanie wieczornej kolacji (to są stale punkty każdego FEMS Council). Federacja opłaca wynajem pomieszczeń na obrady, a koszty hotelu i podróży każdy z uczestników pokrywa we własnym zakresie. Pewne koszty, ale wydaje mi się do zaakceptowania, poniesie PTM. Niemniej z powodu braku do tej pory organizacji FEMS Council w Polsce i ze względów prestiżowych wskazane jest podjęcie tego wysiłku. Warto zaznaczyć, że FEMS przyznało grant w wysokości 3000 Euro na organizację Konferencji 90 lat PTM w Krakowie. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 27-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zorganizowania we wrześniu 2018 r. spotkania FEMS Council w Warszawie.**

6) W związku ze zgłoszoną przez Panią prof. Izabelę Sitkiewicz na ostatnim posiedzeniu ZG PTM chęcią rezygnacji z funkcji Redaktora Naczelnego czasopisma Polish Journal of Microbiology, po rozeznaniu istniejącej sytuacji, postanowiono przychylić się do tej prośby i dokonać odpowiednich zmian kadrowych. Z dniem 01.09.2017 r. powierzono funkcję Redaktora Naczelnego PJM Pani prof. Jolancie Soleckiej z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Jednocześnie Pani prof. Elżbiecie A. Trafny zostaje powierzona funkcja Zastępcy Redaktora Naczelnego PJM (Deputy Editor). Zmiana składu zespołu redakcyjnego została już przeprowadzona przez Redaktora Naczelną PJM. Jednomyślnie podjęto **Uchwałę nr 28-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zmiany Redaktor Naczelnej i członków zespołu redakcyjnego czasopisma Polish Journal of Microbiology.**

7) Trudna sytuacja finansowa PTM, spowodowana przede wszystkim wycofaniem się MNiSW z dofinansowywania czasopism w 2016 r. (otrzymywaliśmy kwoty: 66 970 zł

w 2013 i 2014, 51 000 zł w 2015 r.) wymusza podjęcie drastycznych kroków, aby ograniczyć koszty wydawania i dystrybucji czasopism PJM i PM. Roczny koszt to ponad 120 000 zł. Koszt samych znaczków do wysyłki czasopism to ponad 20 000 zł. PTM jako Towarzystwo którego przychody oparte są na składkach członkowskich nie jest w stanie finansować wydawanego w takiej formie czasopisma, należy w jak najszybszym czasie znaleźć możliwość znacznego zredukowania ponoszonych przez Towarzystwo, czyli nas wszystkich kosztów. Nowa Redaktor Naczelna PJM i zespół redakcyjny zaproponowali zrezygnować z wydawania papierowej wersji czasopisma Polish Journal of Microbiology od stycznia 2018 r. przy pozostawieniu tylko wersji internetowej – online. Większość członków Prezydium PTM podzieliło to stanowisko, przyjmując **Uchwałę nr 29-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zaprzestania wydawania papierowej wersji czasopisma Polish Journal of Microbiology od stycznia 2018 r. i pozostawienia tylko wersji internetowej.**

8) Oszczędności muszą dotyczyć również procesu wydawniczego i dystrybucji Postępów Mikrobiologii. Względy finansowe zmuszają do zrezygnowania z bezpłatnego przekazywania zeszytów PM dla członków PTM. Czasopismo będzie się ukazywało nadal w wersji elektronicznej – online. Jeżeli ktoś z członków PTM chciałby otrzymywać papierową wersję PM, mógłby to uzyskać w 2018 r. w ramach płatnej prenumeraty. Musimy się jednak zorientować ile to by było osób i jaki byłby realny koszt takiej prenumeraty. Druk zostanie utrzymany jedynie dla prenumeratorów (osób i instytucji), a wersja papierowa PM rozsyłana będzie tylko do określonych adresatów w liczbie 100 egzemplarzy. Dokładna liczba prenumeratorów na rok 2018 zostanie określona w grudniu 2017 r. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 30-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zaprzestania od stycznia 2018 r. nieodpłatnej wysyłki czasopisma Postępy Mikrobiologii do członków PTM.**

9) W zamian za zaprzestanie nieodpłatnej wysyłki czasopism PJM i PM członkowie PTM otrzymają od 2018 r. nowy przywilej, tj. możliwość, po zalogowaniu się na stronie PTM, dostępu do najnowszego, bieżącego numeru czasopism PJM i PM. Czyli tylko członkowie PTM, którzy opłacili składki na dany rok, prenumeratorzy, a także członkowie honorowi PTM oraz członkowie wspierający PTM będą mieli dostęp do internetowych wersji najnowszego bieżącego numeru PJM i PM. Pozostałe, starsze numery będą dostępne dla wszystkich osób, także nie należących do PTM. Przypominamy, że przywilejem jest również, iż autorzy korespondencyjni artykułów będący członkami PTM mają zniżkę na opłatę redakcyjną w czasopismach PM i PJM. Członkowie Prezydium jednomyślnie podjęli **Uchwałę nr 31-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie ograniczonego dostępu do bieżących najnowszych numerów PJM i PM w internecie, od stycznia 2018 r. Dostęp do bieżących numerów tych czasopism będzie jedynie dla członków PTM z opłaconą na dany rok składką członkowską dla prenumeratorów oraz dla członków honorowych i wspierających PTM. Pozostałe numery czasopism będą ogólnodostępne.** Prace nad wprowadzeniem systemu logowania do strony PTM już trwają i są zaawansowane.

10) Ponadto w zamian za zaprzestanie nieodpłatnej wysyłki czasopism PJM i PM członkowie PTM otrzymają drugi nowy przywilej, tj. członkowie PTM z opłaconą bieżącą składką członkowską biorący udział w konferencjach współorganizowanych przez PTM będą otrzymywać zniżki na opłatę konferencyjną. Tak było na Zjazdach PTM, na tegorocznej Konferencji 90-lat

PTM i niedawnej konferencji Mikrobiologia Farmaceutyczna. Wysokość zniżek ustalana zostanie przez komitet organizacyjny danej konferencji w porozumieniu z ZG PTM. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 32-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie wprowadzenia zniżki na opłatę konferencyjną dla członków PTM biorących udział w konferencjach współorganizowanych i wspieranych przez PTM, od stycznia 2018 r.**

11) Na ostatnim zebraniu ZG PTM podnoszono sprawę dostępu do środków finansowych PTM przez Oddziały Terenowe. Jak wiadomo główne źródło przychodów PTM to składki członkowskie, z których finansowane jest wydawanie czasopism PM i PJM oraz ich dystrybucja do członków PTM (np. w przypadku dystrybucji PJM do członków PTM konieczna była ok. ponad 50% dopłata Towarzystwa), bieżąca działalność biura PTM i całego Towarzystwa. Składki płacone są nieregularnie i nie są w stanie pokryć kosztów Towarzystwa w dotychczas prowadzonej formie. Stąd poszukiwanie dróg redukcji wydatkowania funduszy poprzez obniżenie kosztów wydawania czasopism. Ponadto poszukujemy dodatkowych źródeł przychodów, jak np. Członków Wspierających PTM. Bardzo słaba jest aktywność Oddziałów Terenowych w pozyskiwaniu dodatkowych środków finansowych, natomiast zgłaszane są potrzeby, stąd propozycja aktywizacji Oddziałów w omawianym obszarze i możliwość pozyskania przez nich środków na swoje cele statutowe. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 33-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie udostępnienia Oddziałom Terenowym PTM od stycznia 2018 r., 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty, na rzecz PTM, przez dany Oddział, na pokrycie kosztów prowadzenia działalności statutowej przez ten Oddział.** Uzyskane kwoty rozliczane byłyby przez biuro i księgowość PTM.

12) Jednomyślnie przyjęto **Uchwałę nr 34-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zmiany sekretarki ZG PTM od 01.11.2017 r.**

13) Aby zostać członkiem zwyczajnym PTM trzeba spełnić 2 warunki – a) wypełnić Deklarację Członka Zwyczajnego oraz b) wnieść składkę członkowską za dany rok. Decyzja ZG PTM o przyjęciu kandydata na członka PTM zapada przed lub po wniesieniu opłaty członkowskiej. Po podjęciu w/w decyzji z biura PTM wysyłany jest e-mail do danej osoby z informacją o przyjęciu w poczet członków PTM i prośbą o opłacenie składki rocznej, jeżeli nie została ona dokonana. Okazało się, że szereg osób wypełnia tylko Deklarację członkowską i nie płaci pierwszej składki członkowskiej, ale uważa się za przyjętych do Towarzystwa, bo taką decyzję podjął ZG PTM. W związku z tą nieprawidłową sytuacją Członkowie Prezydium jednomyślnie podjęli **Uchwałę nr 35-2017 z dnia 12.09.2017 r. w sprawie wprowadzenia poprawki w tekście Deklaracji Członka Zwyczajnego PTM.** W deklaracji zaznaczono: **Pierwsza składka zostanie wpłacona w ciągu 30 dni od otrzymania drogą elektroniczną zawiadomienia o pozytywnej decyzji ZG PTM oraz, że „ZG PTM rekomenduje na podstawie § 28 statutu Towarzystwa, przyjmając – odmówić przyjęcia – kandydata na członka zwyczajnego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Przyjęcie nastąpi po wpłaceniu pierwszej składki członkowskiej”.**

14) Przy okazji organizacji Konferencji 90-lat PTM udało nam się pozyskać 3 nowych Członków Wspierających PTM. Uchwałami Prezydium PTM (**nr 36-2017, nr 37-2017 i nr 38-2017**), jako Członka Wspierającego PTM – srebrnego, przyjęto firmę ECOLAB Sp. z o.o., jako Członka Wspierającego PTM – srebrnego, przyjęto firmę Miejskie Przedsiębiorstwo Wodociągów i kanalizacji S.A. w Krakowie WODOCIĄGI KRAKOWSKIE oraz Członka Wspierającego PTM - zwyczajnego przyjęto firmę MERCK Sp. z o.o.

15) Większością głosów podjęto **Uchwałę nr 39-2017 z dnia 01.11.2017 r., w której wyrażono pozytywną decyzję o objęciu patronatem przez PTM konferencji „Virus of Microbes, 2018” zaplanowanej w dniach 9-13 lipca 2018 r. we Wrocławiu, pod warunkiem uzyskania zniżki 10% (co najmniej 100 zł) na opłatę konferencyjną dla członków PTM.**

16) Wydawanie Polish Journal of Microbiology jest bardzo kosztowne, jakość naukowa szeregu nadsyłanych manuskryptów jest niska. W uzgodnieniu z Redaktorem Naczelnym PJM niezbędne jest wprowadzenie szeregu istotnych zmian w funkcjonowaniu czasopisma. Wychodząc z założenia, że PJM powinno się samofinansować, a ponadto wsłuchując się w głosy delegatów PTM obecnych na Konferencji 90 lat PTM postulujących, aby część środków finansowych PTM udostępnić Oddziałom Terenowym, postanowiono w **Uchwale nr 40-2017 z dnia 01.11.2017 r., przyjętej większością głosów członków Prezydium ZG PTM, aby dla manuskryptów otrzymywanych przez redakcję PJM od 01.07.2018 r. podnieść opłaty redakcyjne za publikację w PJM, odpowiednio: dla autorów korespondencyjnych będących członkami PTM z: 125 USD + 23% VAT do 250 USD + 23% VAT oraz dla pozostałych osób z 250 USD + 23% VAT do 500 USD + 23% VAT.**

17) Ponadto uważamy, że Polish Journal of Microbiology posiada niewykorzystany potencjał naukowy. Proces redakcyjny i wydawniczy prowadzony na wysokim poziomie za pomocą specjalistycznego oprogramowania edytorskiego, połączony z odpowiednią reklamą czasopisma, powinien przynieść wzrost cytowania artykułów PJM i zwiększenie współczynnika Impact Factor. Redakcja PJM korzysta obecnie z firmy edytorskiej Index Copernicus, jednakże współpraca z tą firmą w coraz większym zakresie nie spełnia podstawowych potrzeb i oczekiwań czasopisma, co skutkuje opóźnieniami w procesie wydawniczym i opóźnieniami w publikacji wersji internetowej artykułów. Ponadto Firma edytorska Index Copernicus, z którą źle się współpracuje redakcja PJM, zmienia aktualnie system edytorski, co powoduje bałagan związany z funkcjonowaniem obu systemów edytorskich i widać, że nowy system ma szereg wad. W wyniku rozmów prowadzonych przy współudziale redakcji PJM, z dwoma firmami wydawniczymi, których koszt byłby do zaakceptowania przez PTM, uznano, że firma EXELEY INC. z Nowego Jorku, Stany Zjednoczone, byłaby najbardziej odpowiednia i rokująca nadzieję na poprawę funkcjonowania PJM. **W związku z powyższym jednomyślnie podjęto Uchwałę nr 41-2017 z dnia 01.11.2017 r. w sprawie zmiany firmy edytorskiej umożliwiającej pracę redakcji Polish Journal of Microbiology w profesjonalnym systemie edytorskim oraz wydającej wersję elektroniczną PJM i podpisania umowy na okres 3 lat na wydawanie PJM on-line. Rozmowy z firmą EXELEY INC są zaawansowane i zmierzają do podpisania umowy na nowy system wydawniczy, który byłby uruchomiony od 01.01.2018 r.**

18) Dwaj członkowie PTM otrzymali Granty FEMS na wyjazdy do naukowych ośrodków zagranicznych. Złożone zostały 2 wnioski o granty FEMS dofinansowujące wyjazdy na konferencje naukowe.

15) Podjęliśmy współpracę z Kancelaria Prawną w celu uzyskania opinii odnośnie możliwości powołania Pełnomocników Delegatów na Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów PTM podczas Konferencji 90 lat PTM. Umożliwiło to uzyskanie quorum na Walnym Zgromadzeniu Delegatów wymaganego do wprowadzania zmian w Statucie PTM. Po uzyskaniu wszystkich materiałów z NWZD, z pomocą Kancelarii Prawnej zostanie przygotowany wniosek do sądu (KRS), który zatwierdzi proponowane zmiany Statutu PTM.

16) Bardzo dużo pracy i wysiłku poświęciliśmy na przygotowanie i organizację naszej Konferencji „PTM wczoraj – dziś – jutro”. Odbyla się ona w dniach 22 – 23 września 2017 roku w Auditorium Maximum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Współorganizatorem Konferencji był Uniwersytet Jagielloński; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Katedra Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego. Konferencja została zorganizowana z okazji przypadającej w tym roku 90-tej rocznicy powołania Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 160-lecia urodzin Profesora Odon Bujwida - Ojca mikrobiologii polskiej i twórcy Katedry Higieny na Uniwersytecie Jagiellońskim, a także z okazji 130 rocznicy wygłoszenia przez Profesora na Uniwersytecie Jagiellońskim słynnych „Pięciu odczytów o Bakteryach” uznanych za pierwszy wykład z mikrobiologii i opublikowanych jako pierwszy polski podręcznik mikrobiologii. W konferencji wzięło udział 217 osób, w tym 54 osoby do 35 roku życia, które otrzymały wsparcie finansowe FEMS. Tematyka naukowa Konferencji, wraz z częścią poświęconą historii polskiej mikrobiologii oraz upamiętnieniu działalności i zasług Prof. Odon Bujwida, dała możliwość zaprezentowania współczesnych osiągnięć z różnych dyscyplin mikrobiologii. Odbłyły się sesje wykładowe z zakresu mikrobiologii lekarskiej, weterynaryjnej, przemysłowej, żywności i środowiska. Wyniki badań naukowych były również prezentowane w trakcie sesji plakatowych, na których przedstawiono 148 plakatów. Uczestnicy konferencji otrzymali reprint wygłoszonych wykładów Prof. O. Bujwida, zamieszczonych w publikacji „PIĘĆ ODCZYTÓW O BAKTERIACH Rys ogólnych zasad bakteriologii w zastosowaniu do chorób zakaźnych z dołączeniem uwag o surowicach leczniczych. szczepieniach ochronnych i dezynfekcyi z tablicą zdjęć mikro-fotograficznych własnych” wydanie trzecie znacznie poszerzone, opublikowanych w 1907 roku, Skład.Główny w księgarni Gebethnera i Sp.

Konferencja była także okazją do zaprezentowania działalności i historii 14 terenowych oddziałów PTM.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
A. Laudy
dr n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

ZASADY PRZYGOTOWYWANIA ARTYKUŁÓW KIEROWANYCH DO PUBLIKACJI W KWARTALNIKU „MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA”

W kwartalniku „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia” zamieszczane są prace doświadczalne i metodyczne z dziedziny mikrobiologii medycznej w zakresie zakażeń bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych i zarażeń pasożytniczych oraz ich oddziaływanie na zdrowie publiczne. W szczególności publikowane są prace dotyczące chorobotwórczości drobnoustrojów, ich zróżnicowania, lekooporności i ekologii w aspektach oddziaływania na społeczeństwo, ochronę zdrowia i jej ekonomikę. Publikowane są również prace poglądowe z wyżej wymienionej dziedziny, krótkie komunikaty z prac doświadczalnych oraz komentarze i listy do redakcji mające charakter dyskusji z autorami artykułów zamieszczonych w kwartalniku.

I. Zasady obowiązujące przed skierowaniem artykułu do publikacji.

1. Autorzy

Autorem artykułu powinna być każda osoba, która wniosła intelektualny wkład w zakresie: tematu, treści i wniosków pracy lub uzyskała i interpretowała eksperymentalne dane przedstawione w artykule. Osoby wykonujące oznaczenia laboratoryjne bez interpretacji ich wyników, dostarczające próbki materiału do badań, szczepy mikroorganizmów, odczynniki, aparaturę badawczą a także osoby, które dokonały krytycznej oceny tekstu pracy mogą być wymienione w podziękowaniach.

Autorzy powinni wybrać spośród siebie jedną osobę odpowiedzialną za korespondencję z redakcją i upoważnić ją do reprezentowania ich we wszystkich sprawach związanych z publikacją. Autorzy artykułu powinni wyrazić zgodę na jego opublikowanie, co powinno być potwierdzone pisemnym oświadczeniem autora przesyłającego artykuł do redakcji czasopisma.

Autor zgłaszając artykuł do druku, powinien nadesłać pisemne oświadczenie, że praca nie została i nie zostanie złożona do druku w innym czasopiśmie przed opublikowaniem jej w kwartalniku „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia”, oraz że wszyscy autorzy zapoznali się z regulaminem zamieszczania prac w kwartalniku i w pełni go akceptują. Autor zgłaszający artykuł do druku powinien podać swój dokładny adres do korespondencji wraz z numerem telefonu i adresem poczty elektronicznej.

W celu przeciwdziałania przypadkom „ghostwriting” i „guest authorship” Redakcja kwartalnika wprowadza następujące wymagania w stosunku do autora zgłaszającego manuskrypt:

- na autorze zgłaszającym artykuł spoczywa obowiązek ujawnienia wkładu poszczególnych autorów w powstanie publikacji z podaniem ich afiliacji oraz kontrybucji, tj. informacji kto jest autorem koncepcji, założeń, metod, protokołu itp. wykorzystywanych przy przygotowaniu publikacji.
- na autorze zgłaszającym artykuł spoczywa obowiązek ujawnienia informacji o źródłach finansowania publikacji, wkładzie instytucji naukowo – badawczych, stowarzyszeń i innych podmiotów,
- na autorze zgłaszającym artykuł spoczywa obowiązek złożenia w imieniu wszystkich autorów deklaracji o występowaniu lub nie występowaniu konfliktu interesów.

Formularz oświadczenia autora zgłaszającego artykuł znajduje się na stronie internetowej kwartalnika <http://www.medmikro.org.pl/>

Redakcja zobowiązana jest do ujawniania i dokumentowania wszelkich przejawów nierzetelności naukowej typu „ghostwriting” i „guest authorship”, włącznie z powiadomieniem odpowiednich podmiotów takich jak instytucje zatrudniające autorów, towarzystwa naukowe, stowarzyszenia edytorów czasopism naukowych itp.

W przypadku publikacji wyników badań przeprowadzonych na zwierzętach wymagane jest dołączenie oświadczenia, że na ich wykonanie uzyskano zgodę lokalnej komisji etycznej. W przypadku badań klinicznych wymagane jest oświadczenie, że badania zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej (www.wma.net).

Redakcja zastrzega sobie prawo do odmowy przyjęcia artykułu w przypadku braku powyżej wymaganych dokumentów.

2. Powtórna publikacja

Jest to publikacja zawierająca istotne elementy pracy już uprzednio opublikowanej. Czytelnicy czasopism medycznych mają prawo wierzyć, że publikowany artykuł jest pracą oryginalną. Jeżeli tak nie jest, artykuł powinien być poprzedzony wyraźnym oświadczeniem, że jest on powtórnie publikowany i powody takiej publikacji powinny być sprecyzowane. Należy również podać bibliograficzną pozycję pierwotnej publikacji.

II. Instrukcja dotycząca przygotowania artykułu.

Prace przeznaczone do druku powinny być nadsyłane do redakcji w 2 egzemplarzach wydruku komputerowego o formacie A4 z zachowaniem marginesu 4 cm z lewej strony i podwójnych odstępów pomiędzy wierszami (31 wierszy na stronie). Poszczególne strony powinny być numerowane.

Należy załączyć kopię artykułu na płycie CD Alternatywnie dopuszcza się przesyłanie kopii artykułu pocztą elektroniczną na adres e-mailowy redakcji: medmikrobiol@pzh.gov.pl. Autorzy powinni upewnić się, że tekst w formie elektronicznej jest identyczny z tekstem wydruku. Tekst pracy, tabele oraz ryciny należy przysyłać w osobnych plikach.

Pierwsza strona artykułu powinna zawierać kolejno: tytuł pracy w języku polskim, tytuł pracy w języku angielskim, pełne imię (imiona) i nazwisko autora (autorów) pracy, nazwę instytucji, w której wykonano pracę wraz z jej adresem (adresami). Słowa kluczowe w języku polskim i angielskim. Na kolejnych stronach należy umieścić tekst artykułu.

W tekście artykułu oryginalnego należy wyróżnić następujące części: Krótkie streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wstęp, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja (lub Wyniki i ich omówienie), Wnioski (lub Podsumowanie), Piśmiennictwo, Udział poszczególnych autorów w powstaniu pracy i ewentualne Podziękowania. Poszczególne części artykułu mogą być wyróżnione podtytułami, o ile uczyni to tekst bardziej przejrzystym.

W tekście artykułu poglądowego należy wyróżnić jedynie następujące części: Krótkie streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wprowadzenie, Właściwy tekst artykułu opatrzony podtytułami, Podsumowanie, Piśmiennictwo, Udział poszczególnych autorów w powstaniu pracy i ewentualne Podziękowania.

Krótkie komunikaty z prac doświadczalnych powinny zawierać główne części pracy oryginalnej.

Wszystkie słowa i nazwy łacińskie, nazwiska cytowanych autorów (zarówno w tekście jak i piśmiennictwie) oraz nazwiska autorów pracy należy pisać kursywą.

Krótkie streszczenie w języku polskim - umieszczone między tytułem a streszczeniem w języku angielskim, powinno wprowadzić czytelnika w treść pracy. Streszczenie to powinno być pisane pogrubioną czcionką i nie powinno przekraczać 6 wierszy maszynopisu.

Streszczenie (Abstract) - w języku angielskim powinno odzwierciedlać strukturę pracy, tj. zawierać następujące, wyszczególnione rozdziały:

- Introduction – z podaniem celu pracy,
- Methods – zawierające podstawowe metody i procedury,
- Results – główne obserwacje i wyniki
- Conclusion – krótkie podsumowanie lub najważniejsze wnioski.

Streszczenie nie powinno być dłuższe niż 500 słów oraz powinno być poprzedzone tytułem pracy oraz słowem „Abstract”

Wstęp - należy uzasadnić cel podjęcia badań i wyraźnie go sprecyzować. Cytowane we wstępie piśmiennictwo należy ograniczyć tylko do pozycji mających bezpośredni związek z treścią wstępu. We wstępie nie podaje się wyników ani wniosków z przeprowadzonych badań.

Material i metody – należy podać informacje dotyczące przedmiotu badań, zastosowanych metod i użytych odczynników w sposób na tyle wyczerpujący, aby umożliwić czytelnikowi powtórzenie doświadczenia lub obserwacji. Należy precyzyjnie opisać leki, szczepionki, odczynniki czy substancje stosowane w pracy. Dla powszechnie znanych metod należy podać pozycje piśmiennictwa, łącznie z metodami statystycznymi stosowanymi w pracy, dla metod już opublikowanych ale powszechnie nieznanymi, podać krótki opis z pozycjami piśmiennictwa, natomiast dla nowych lub istotnie zmodyfikowanych metod – podać ich pełny opis. Podtytuły należy pisać pogrubioną czcionką.

Wyniki – należy podać w logicznej sekwencji w tekście, tabelach i rycinach. Danych z tabel i rycin nie należy powtarzać w tekście. Należy ograniczyć się do podsumowania najważniejszych informacji.

Dyskusja – należy podkreślić nowe lub ważne aspekty wyników badań i omówić implikacje wypływające z ich przeprowadzenia oraz podać ich ograniczenia. Wyniki własnych badań powinny być ocenione na tle piśmiennictwa cytowanego przez autorów artykułu. Nie należy powtarzać szczegółowych danych przedstawionych w poprzednich częściach artykułu.

Wnioski – jeżeli autor uważa je za konieczne należy je sprecyzować w punktach lub podać krótko w formie opisowej. Powinny one łączyć się logicznie z celami pracy przedstawionymi we wstępie. Należy unikać stwierdzeń i wniosków nie wynikających z własnej obserwacji. Autorzy powinni wystrzegać się stwierdzeń na temat kosztów lub korzyści, jeżeli ich praca nie zawiera ekonomicznych danych i ich analizy. Jeżeli proponuje się hipotezę, należy jasno podać że jest to hipoteza. Należy unikać daleko idących wniosków z pracy, która nie została jeszcze zakończona. We wnioskach nie należy zamieszczać wyników pracy. Wnioski mogą być zastąpione krótkim Podsumowaniem, w którym autor może zwrócić uwagę na najważniejsze aspekty pracy.

Piśmiennictwo – należy pisać na osobnych stronach i ograniczyć tylko do pozycji cytowanych w tekście i mających bezpośredni związek z tematem pracy. W przypadku prac oryginalnych - nie więcej niż 25 pozycji, w przypadku prac poglądowych - 50 pozycji. Pozycje piśmiennictwa powinny być ułożone w porządku alfabetycznym wg nazwisk autorów. Przy cytowaniu prac w tekście należy podać w nawiasach tylko liczbę porządkową odnośnej publikacji w spisie piśmiennictwa. Należy również podać pozycje cytowane w tabelach lub w legendzie rycin, oraz unikać cytowania streszczeń i nie publikowanych prac i sprawozdań. Prace akceptowane do druku, ale jeszcze nie opublikowane powinny być oznaczone jako: „w druku”; autorzy powinni uzyskać pisemną zgodę na zacytowanie takiej pracy, jak też potwierdzenie, że cytowana praca została zaakceptowana do druku. Informacje pochodzące z manuskryptów przesłanych do redakcji, ale nie zaakceptowanych do druku powinny być jako „nieopublikowana praca” w tekście, a nie w wykazie piśmiennictwa, po uzyskaniu pisemnego pozwolenia od autora. Należy unikać cytowania „Informacja własna” lub „informacja osobista”, chyba że dane takie dostarczają istotnych informacji niedostępnych z publikowanych źródeł. W takich przypadkach nazwisko osoby i data uzyskania informacji powinny być cytowane w tekście.

W wykazie piśmiennictwa należy zachować następującą kolejność:

- a) nazwisko autora (-ów) i pierwsze litery ich imion,
- b) tytuł artykułu w pełnym brzmieniu,
- c) tytuł czasopisma w uznanym skrócie (według the List of Journal Indexed in Index Medicus);
- d) rok;
- e) tom;
- f) pierwsza i ostatnia strona artykułu.

Dla wydawnictw nieperiodycznych (np. książek) należy podać autora (autorów jak wyżej) tytuł rozdziału w pracach zbiorowych, tytuł książki, nazwisko jej redaktora, wydawcę, miejsce i rok wydania oraz strony od – do cytowanego rozdziału.

Przy większej liczbie autorów należy podać wszystkie nazwiska (do czterech autorów) lub nazwiska pierwszych trzech z dopiskiem „i inni”, gdy autorów jest więcej niż czterech.

Przykłady:

Artykuł z czasopisma medycznego:

1. *Schmitt-Grohe S, Cherry JD, Heiningen U* i inni. Pertussis in German adults. Clin Infect Dis 1995; 21: 860 – 6.
2. *Kostrzewski J*. Postępy wykorzystania poliomyelitis w świecie. Przegl Epidemiol 1994; 48: 355 – 60.
3. *Naruszewicz-Lesiak D, Wiczorkiewicz N, Iwińska-Buksowicz B* i inni.. Podostre stwardniające zapalenie mózgu (SSPE) w Polsce w latach 1990-1993. V etap badań epidemiologicznych. Przegl Epidemiol 1995; 49: 261-6.

Książki i monografie

1. (Autorzy) *Juszczak J, Gładysz A*. Diagnostyka różnicowa chorób zakaźnych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Wydanie II. Warszawa 1996.
2. (Organizacja jako autor) World Health Organization/ United Nations Children`s Fund. State of the world`s vaccines and immunization. WHO Geneva 1996.

3. (Rozdział w książce) *Krotochwil-Skrzypkowa M.* Odczyn i powikłania poszczepienne. W: *Szczepienia ochronne*. Red. *B. Dębiec, W. Magdzik*, PZWL, Warszawa 1991, 76 – 81.
4. (Doniesienie na konferencji). *Galęzka A.* Current trends of pertussis in developing and developed countries. Presented at the National Institutes of Health Pertussis Conference: Acellular Pertussis Vaccine Trials: Results and Impact on US Public Health. Washington, DC, June 3 – 5, 1966.

Tabele

Tabele należy pisać na oddzielnych stronach i ponumerować kolejno cyframi rzymskimi. Numeracja tabel powinna odpowiadać chronologii ich pojawiania się w tekście. Tabele powinny być zaopatrzone w tytuły (u góry). Każda kolumna tabeli powinna posiadać krótki nagłówek a szersze wyjaśnienia powinny być zamieszczone w odnośnikach pod tabelą a nie w nagłówku. W wyjaśnieniach należy wyraźnie opisać statystyczne miary zmienności takie jak standardowe odchylenie czy standardowy błąd średnich. Liczbę tabel należy ograniczyć tylko do istotnie niezbędnej dla dokumentacji uzyskanych wyników.

Ryciny

Ryciny i fotografie należy przygotować techniką komputerową i przesłać do redakcji plikach w postaci oddzielnych graficznych następujących formatów: TIF, BMP, JPG. Pod każdą ryciną należy umieścić podpis (np. Ryc. 1.....) z niezbędnymi objaśnieniami. Ryciny powinny być w kolorze czarno – białym.

W odpowiednim miejscu tekstu należy podać w nawiasach kolejne numery rycin lub tabel np. (Ryc.1) lub (Tab.1). Miejsca włączenia materiału ilustracyjnego powinny być zaznaczone ołówkiem na marginesie maszynopisu.

Objętość artykułów

Oryginalna praca naukowa nie może przekraczać 15 stron maszynopisu włączając tabele, ryciny, piśmiennictwo i streszczenie w języku angielskim. Prace pogładowe nie mogą przekraczać 20 stron maszynopisu. Krótkie komunikaty nie mogą przekraczać objętości 3 stron maszynopisu sporządzonego zgodnie ze wskazówkami podanymi dla prac oryginalnych. Listy do redakcji przeznaczone do opublikowania nie mogą przekraczać 2 stron maszynopisu i powinny być zaopatrzone imieniem i nazwiskiem autora oraz adresem miejsca pracy lub prywatnym.

Zasady ogólne

Redakcja zastrzega sobie prawo poprawienia usterek stylistycznych i nazewnictwa oraz dokonania koniecznych skrótów, bez porozumienia z autorem.

Redakcja nie zwraca artykułów nie przyjętych do druku. Za opublikowane artykuły autorzy nie otrzymują honorarium. Wydawca nabywa na zasadzie wyłączności ogół praw autorskich do wydrukowanych prac, w tym prawo do wydawania drukiem, na nośnikach elektronicznych, CD i innych oraz umieszczania ich w Internecie.

