

MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

ORGAN NARODOWEGO INSTYTUTU ZDROWIA PUBLICZNEGO
- PAŃSTWOWEGO ZAKŁADU HIGIENY

2-4

ROK LXX KWARTALNIK 2018
NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO -
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNĄ I MIKROBIOLOGIĄ
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).

W latach 1949 - 2017 kwartalnik Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia ukazywał się
jako organ Państwowego Zakładu Higieny (obecnie Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego -
Państwowy Zakład Higieny) w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

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



Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
- Państwowy Zakład Higieny

„100 LAT TROSKI O ZDROWIE POLAKÓW”

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny jest najstarszą instytucją zdrowia publicznego w Polsce.

W 2018 r. obchodzimy 100-lecie Naszego Instytutu, który został utworzony jako Państwowy Centralny Zakład Epidemiologiczny, w 1923 r. przemianowany na Państwowy Zakład Higieny (PZH), a od 2007 r. nosi nazwę: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny.

Powstanie naszej instytucji było reakcją władz Odrodzonej Polski na zagrożenia zdrowotne ludności na terenach dawnych zaborów rosyjskiego i austriackiego po wybuchu Rewolucji Październikowej i kapitulacji Niemiec w I Wojnie Światowej. Zniszczenia wojenne, powojenna nędza i przemieszczanie się ze wschodu setek tysięcy repatriantów i uchodźców spowodowało występowanie epidemii licznych chorób, z których najgroźniejszymi były epidemie duru plamistego i duru brzuszego.

Historia instytucjonalnego zwalczania i zapobiegania epidemiom w Odrodzonej Polsce rozpoczęła się od powołania w sierpniu 1919 r. Centralnego Komitetu do walki z durem plamistym, a następnie w marcu 1920 r. Naczelnego Nadzwyczajnego Komisariatu do walki z epidemiami, któremu zawdzięczamy organizację kordonów sanitarnych i skuteczne zwalczenie epidemii.

Państwowy Zakład Higieny powstał jako wcześniej przygotowywane zaplecze naukowe i laboratoryjne tych działań, ale od samego początku był projektowany, według dalekosiężnej wizji Ludwika Rajchmana (pierwszego dyrektora PZH w latach 1918-1932), jako nowoczesny instytut ogarniający swą działalnością ekspercką podstawowe domeny zdrowia publicznego.

Z biegiem lat zakres działalności Instytutu był dostosowywany do zmieniających się potrzeb i wyzwań w zakresie ochrony zdrowia społeczeństwa. Działalność naukowa, usługowa i szkoleniowa obejmowała zawsze podstawowe zagrożenia i problemy zdrowia publicznego.

Początkowo zakres działalności naukowo-badawczej i usługowej Instytutu obejmował takie zagadnienia jak profilaktyka, diagnostyka i leczenie chorób zakaźnych, higiena pracy, higiena psychiczna i higiena odżywiania, badania żywności i przedmiotów użytku, inżynieria sanitarna i administracja sanitarna, jak również kontrola surowic i szczepionek oraz innych leków. Niektóre z tych dziedzin rozrosły się i wymagały powołania odrębnych placówek naukowych. W ten sposób z Państwowego Zakładu Higieny wyłoniły się: Instytut Leków, Instytut Żywności i Żywienia, Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej i Instytut Antybiotyków, a nasz Instytut podjął nowe wyzwania.

Obecnie, w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego - Państwowym Zakładzie Higieny są wyodrębnione dwa pioniry naukowe:

Analiz i Strategii w Zdrowiu Publicznym, który zajmuje się monitorowaniem i analizą stanu zdrowia ludności, analizami ekonomicznymi i systemowymi ochrony zdrowia, promocją zdrowia i prewencją chorób przewlekłych, a także problematyką kształcenia i komunikacji w zdrowiu publicznym.

Bezpieczeństwa Epidemiologicznego i Środowiskowego, który zajmuje się nadzorem nad chorobami zakaźnymi, ich szerzeniem się oraz czynnikami ryzyka, promowaniem szczepień i bezpieczeństwem szczepionek, diagnostyką oraz różnicowaniem drobnoustrojów chorobotwórczych, metodami unieszkodliwiania czynników zakaźnych, a także identyfikacją i oceną potencjalnie szkodliwych czynników chemicznych, fizycznych i mikrobiologicznych w żywności, wodzie, powietrzu i wybranych elementach środowiska, a także oceną ryzyka zdrowotnego.

Instytut współpracuje z wieloma ośrodkami naukowymi i instytucjami zarówno krajowymi, jak i międzynarodowymi (WHO, Komisja Europejska, ECDC).

Obchody 100-lecia Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny odbywają się pod hasłem: „100 LAT TROSKI O ZDROWIE POLAKÓW”. Zostały one objęte Patronatem Honorowym Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Andrzeja Dudy.

*Dyrekcja Instytutu,
Komitet Naukowy i Komitet Organizacyjny Obchodów 100-lecia NIZP-PZH*

SPIS TREŚCI

PRACE ORYGINALNE

- M. Brzywczy-Włoch, D. Ochońska, A. Dobrut, E. Olchawa, M. Bulanda. Charakterystyka kolekcji własnej szczepów klinicznych z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów 115
- J. Kowalski. Chorobotwórczość *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w świetle ostatnich badań 129
- W. Rastawicki, N. Rokosz-Chudziak, K. Śmietańska, A. Chróst, U. Roguska. Diagnostycznie znamienne poziomy przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce 139
- K. Zacharczuk. Charakterystyka obecności genetycznych determinantów warunkujących oporność pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 izolowanych w Polsce w 2009 r. na wybrane antybiotyki β -laktamowe 149
- D. Wultańska, P. Obuch-Woszczatyński, M. Piotrowski, H. Pituch. Ocena stężenia kalprotektyny kałowej w próbkach pacjentów z zakażeniem *Clostridium difficile* 159
- K. Śmietańska, A. Chróst, N. Rokosz-Chudziak, U. Roguska, W. Rastawicki. Ocena ochronnego poziomu przeciwciał dla toksyny tężcowej u osób dorosłych w Polsce 167
- M. Gizińska, M. Połaska, Z. Ochal, M. Staniszevska. Nowe pochodne sulfonowe i sulfanylowe o działaniu przeciugrzybicznym 175

PRACE POGLĄDOWE

- A. Chojecka, P. Tarka, K. Kanecki, A. Nitsch-Osuch. Znaczenie normy PN-EN 16615: 2015 w ocenie aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych przeznaczonych do nasączania chusteczek w obszarze medycznym 185
- N. Rokosz-Chudziak, W. Rastawicki, K. Śmietańska. Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń wywołanych przez *Listeria monocytogenes* 191
- A.K. Kierzkowska. Charakterystyka i oporność na wybrane środki dezynfekujące przetrwalników laseczek *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* 201
- W. Rastawicki. Charakterystyka humoralnej odpowiedzi w poszczególnych podklasach IgG w przebiegu wybranych zakażeń bakteryjnych u ludzi 209

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- M. Brzychczy-Włoch, D. Ochońska, A. Dobrut, E. Olchawa, M. Bulanda. Characteristics of own collection of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains, hosts of bacteriophages 115
- J. Kowalski. Pathogenicity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in the light of recent research 129
- W. Rastawicki, N. Rokosz-Chudziak, K. Śmietańska, A. Chróst, U. Roguska. Establishment of the diagnostic cut-off points for levels of serum antibodies to pertussis toxin in adults in Poland 139
- K. Zacharczuk. Presence of β -lactamase encoding genes in clinical isolates of *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8 isolated in Poland in 2009..... 149
- D. Wultańska, P. Obuch-Woszczatyński, M. Piotrowski, H. Pituch. Assessment of fecal calprotectin concentration in samples from patients with *Clostridium difficile* infection 159
- K. Śmietańska, A. Chróst, N. Rokosz-Chudziak, U. Roguska, W. Rastawicki. Evaluation of the protective level of antibodies to tetanus toxin in adults in Poland 167
- M. Gizińska, M. Połaska, Z. Ochal, M. Staniszevska. New sulfone and sulfanyl derivatives with antifungal activity 175

REVIEWS

- A. Chojecka, P. Tarka, K. Kanecki, A. Nitsch-Osuch. Importance of the PN-EN 16615: 2015 standard in the assessment of bactericidal activity of disinfectants intended for soaking wipes in medical area 185
- N. Rokosz-Chudziak, W. Rastawicki, K. Śmietańska. Microbiological diagnosis of infections caused by *Listeria monocytogenes* 191
- A. K. Kierzkowska. Characteristics and resistance to selected disinfectants of bacterial spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* 201
- W. Rastawicki. Characteristics of humoral response in individual IgG subclasses in the course of selected bacterial infections in humans 209

Charakterystyka kolekcji własnej szczepów klinicznych z gatunku
Pseudomonas aeruginosa, gospodarzy bakteriofagów

Characteristics of own collection of *Pseudomonas aeruginosa* clinical
strains, hosts of bacteriophages

Monika Brzychczy-Włoch¹, Dorota Ochońska¹, Anna Dobrut¹, Ewa Olchawa²,
Małgorzata Bulanda¹

¹Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii,
Wydział Lekarski, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
²Instytut Biotechnologii, Surowic i Szczepionek BIOMED Spółka Akcyjna, Kraków

W opracowaniu przedstawiono charakterystykę kolekcji klinicznych izolatów *P. aeruginosa*, gospodarzy-bakteriofagów, wykorzystanych jako szczepy indykatorowe do badania zakresu litycznego fagów p/*P. aeruginosa*. Bakterie scharakteryzowano pod względem określenia zakresu profilu lekooporności, czynników wirulencji oraz zmienności genetycznej. Zastosowane w zaprezentowanej pracy metody fenotypowe i molekularne wykazały znaczne zróżnicowanie badanych szczepów- gospodarzy, w tym zidentyfikowano 18 profili lekooporności, odnotowano wysoki odsetek szczepów posiadających geny wirulencji, uzyskano 18 unikalnych wzorów restrykcyjnych PFGE.

Słowa kluczowe: bakteria-gospodarz, fagotypowanie, PFGE, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Introduction: The paper presents the phenotypic and molecular characteristics of the collection of 18 *P. aeruginosa* clinical isolates used as host indicators to study the lytic range of 12 phages against *P. aeruginosa*.

Methods: The phages host ranges were assayed by spot tests. Phenotypic characteristics of strains was investigated by the API 20NE biochemical fingerprinting, oxidase tests, the production of pyocyanin, fluorescein and L-arginine dihydrolase. Resistance profiles were analyzed. The PCR method and sequencing were used to study the distribution of the genes of alkaline protease (*aprA*), exotoxin A (*exoA*), elastase B (*lasB*), exotoxins (*exoS/T/U/Y*), phenazine modifying genes (*phzM*, *phzS*) and to identify selected β-lactamases (*bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{PER}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{VIM}). Additionally, the genetic diversity was investigated by PFGE.

Results: Twenteen newly isolated *P. aeruginosa* phages were found to lyse 100% of the analyzed strains. Phages PAR_3 and PAR_10 exhibited the highest lytic activity against isolates, lysing, 77,8% strains tested. The other phages, PAR_9 and PAR_12, presented generally weaker activity against bacteria, lysing respectively, 50% and 44,4% of tested strains. *AprA*, *exoA*, *phzM*, *phzS* were presented in all strains; *lasB* in 77,8%. The most frequently combination of egzoenzyme genes S⁺/T⁺/U⁻/Y⁺ in 78% isolates was remarked. In collection, 18 different resistance profiles were observed and 44% isolates were classified as MDR. The *bla*_{GES} was the most prevalent gene (44%), followed by *bla*_{SPM-1} and *bla*_{TEM} detected in 17% and 11,1% isolates, respectively. *Bla*_{OXA-2} was detected in only 5,5% of all isolates. In PFGE method, 18 singletons (A-S) were identified. No relationship between resistance, virulence and PFGE groups was found.

Conclusion: In summarize, all phages infect multiple host species and showed a broad lytic spectrum. All bacteria tested were infected by multiple phages and displayed a wide range of susceptibility. In general, we observed a high degree of genetic diversity and individuality of the studied *P. aeruginosa* collection, bacteriophage hosts.

Key words: host bacterium, phage typing, PFGE, *Pseudomonas aeruginosa*

WSTĘP

Pseudomonas aeruginosa pozostaje jednym z najważniejszych czynników chorobotwórczych człowieka wywołując szereg poważnych zakażeń szczególnie u pacjentów z osłabioną odpornością np. po oparzeniach, po przeszczepach, u pacjentów z mukowiscydozą czy u pacjentów onkologicznych (3). Zakażenia wywoływane przez ten oportunistyczny patogen są niezwykle trudne do zwalczania w związku z licznymi mechanizmami oporności naturalnej i nabytej w drodze mutacji chromosomalnych lub horyzontalnego transferu genów (ang. *Horizontal Gene Transfer*, HGT) (10). Dodatkowo, gatunek ten może rozwijać szereg innych mechanizmów oporności jak enzymatyczna inaktywacja leku, zmniejszenie przepuszczalności osłon czy nadekspresja aktywności pomp typu *efflux*. Nagromadzenie kilku różnych determinant oporności prowadzi do selekcji szczepów typu MDR (ang. *Multi-Drug Resistant*), XDR (ang. *Extensively-Drug-Resistant*) oraz PDR (ang. *Pan-Drug-Resistant*) (15).

Duży genom *P. aeruginosa* składa się z genomu podstawowego (ang. *Core Genome*) i genomu dodatkowego (ang. *Accessory Genome*). Analizy genomów wykazały, że fundamentalne znaczenie dla zdolności adaptacji do różnych środowisk oraz zróżnicowania w obrębie gatunku *P. aeruginosa* ma genom dodatkowy (11). Strukturę populacji *P. aeruginosa* w dużej mierze determinuje informacja genetyczna zawarta w genomie dodatkowym w skład którego mogą wchodzić integrony, transpozony, plazmidy, sekwencje ICE (ang. *Integrative and Conjugative Elements*), sekwencje insercyjne oraz profagi. Bakteriofag ϕ CTX podnosi zjadliwość *P. aeruginosa*, dzięki genowi *ctx* kodującemu toksynę typu PFT (ang. *Pore-Forming Toxin*) zdolną do przerywania ciągłości błony komórkowej atakowanej komórki bakteryjnej. Z kolei infekcja szczepu bakteriofagiem D3 prowadzi do modyfikacji w strukturze LPS i może przyczyniać się do efektywniejszej adhezji bakterii

do powierzchni komórek gospodarza (serokonwersja). Natomiast infekcja bakteriofagiem FIZ15, powoduje większą odporność bakterii na fagocytozę (11). Wszystkie wymienione elementy genetyczne zlokalizowane są w regionach plastyczności genomu RGP (ang. *Region of Genome Plasticity*) będącymi punktami insercji wysp genomowych lub profagów (10). DNA profagów włączone w genom gospodarza może podnosić stopień zjadliwości drobnoustroju, jak również wpływać na modyfikację struktury lipopolisacharydu (LPS) oraz warunkować większą odporność patogenu na fagocytozę, liczne antybiotyki i metale ciężkie (11). Czynniki wirulencji *P. aeruginosa* kodowane przez genom w obrębie wysp patogenności PAGI (ang. *P. aeruginosa Genomic Island*) lub wysp genomowych, mogą być wydzielane pozakomórkowo w tym: egzotoksyna A (gen *exoA*) której działanie polega na miejscowym uszkodzeniu tkanek oraz hamowaniu syntezy komórek gospodarza; egzoenzymy (S,T,U,Y) (geny *exo S,T,U,Y*) odpowiadające za spowolnienie procesu fagocytozy, wywoływanie efektu cytopatycznego względem komórek nabłonkowych i makrofagów oraz uczestniczące w reorganizacji cytoszkieletu komórki eukariotycznej; fosfolipaza C (PLC) hemolizyna niszcząca surfaktant płucny może przyczyniać się do rozwoju niedodmy płucnej, dodatkowo pośredniczy w szlakach przekazywania sygnałów związanych z procesami regulującymi metabolizm komórki, jej wzrost i różnicowanie, a także w indukowaniu apoptotycznej śmierci komórki; elastaza rozkładająca białka strukturalne, biorąca udział w degradacji połączeń między komórkami nabłonkowymi oraz inaktywująca ludzki inhibitor proteinaz α -1 oraz immunoglobuliny IgG, IgA; alkaliczna proteaza (gen *aprA*) i elastazy (geny *lasA*, *lasB*) uszkodzające komórki i tkanki organizmu gospodarza; plocjanina (*phzM*, *phzS*), fluoresceina, inne barwniki, enzymy, toksyny lub związane z komórką, tj. LPS, rzęski, pile. Wydzielanie to odbywa się za pośrednictwem czterech głównych systemów sekrecji (ang. *Type ... Secretion System*), T1SS (alkaliczna proteaza), T2SS (egzotoksyna A, elastaza B), T3SS (egzoenzymy (S,T,U,Y) oraz T6SS (1). Regulacja wytwarzania czynników wirulencji zależna jest od mechanizmu QS (ang. *Quorum Sensing*) kontrolującego ekspresję wielu genów i odbywa się przy udziale środowiskowych autoinduktorów typu AHL i AQ. Dzięki tym mechanizmom komórka bakteryjna jest w stanie kontrolować liczebność populacji, jak również dostosowywać się do zmieniających się warunków poprzez ekspresję konkretnych genów (11).

Ze względu na wyżej wymienione czynniki wciąż rosnąca liczba wielolekoopornych izolatów *P. aeruginosa* zmusza do poszukiwania nowych narzędzi terapeutycznych, np. preparatów bakteriofagowych jako alternatywy dla antybiotyków.

Celem niniejszej pracy była szczegółowa charakterystyka własnej kolekcji szczepów klinicznych z gatunku *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów, wykorzystanych jako szczepy homologiczne do izolacji specyficznych bakteriofagów terapeutycznych.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Badaniami objęto 18 izolatów *P. aeruginosa* pochodzących z kolekcji szczepów gospodarzy bakteriofagów Instytutu Biotechnologii Surowic i Szczepionek BIOMED Spółka Akcyjna w Krakowie. Izolaty *P. aeruginosa* pochodziły z różnych materiałów klinicznych, w tym wymazów z ucha (3 izolaty), ran (11 izolatów) oraz od pacjentów z mukowiscydozą (4 izolaty) (Tabela I). Hodowle bakteryjne prowadzone były na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej (BLA, bioMérieux), agarze MacConkey'a (Biocorp),

agarze Kinga B (Biocorp), podłożu TSB (Biocorp), płynnym podłożu BHI (Oxoid), płynnym podłożu Philipsa w temp. 37°C. Identyfikacji gatunkowej dokonano w oparciu o klasyczne metody fenotypowe (morfologia kolonii, wytwarzanie plocjaniny i fluoresceiny, wytwarzanie L-dwuhydrolazy argininy oraz test na oksydazę cytochromową (BBL™DrySlide™, Becton Dickinson) włączając metody biochemiczne z użyciem testu ID 32 GN oraz systemu miniAPI (bioMérieux). Do przechowywania kultur bakteryjnych w -70°C celu przeprowadzenia dalszych analiz wykorzystano system Microbank®Mix (Biocorp).

Test ang. host range. Określenie zakresu aktywności litycznej 12 fagów przeprowadzono z użyciem 18 izolatów klinicznych *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów (Tabela II). Fagotypowanie prowadzono w RTD (ang. *Routine Test Dilution*) i 100xRTD wykonując ang. *spot test* wg metody Postic i inni (21), zmodyfikowanej. Odczytu i interpretacji wyników dokonywano zgodnie z kryteriami przez określenie ilości lysinek PFU (ang. *Plaque Forming Unit*) w miejscu naniesienia faga. W celu sprawdzenia poprawności wykonania testu i wykluczenia reakcji fałszywie dodatnich, dla każdego szczepu wykonano kontrole ujemne. Test ang. *host range* wykonano dla każdego z badanych fagów co najmniej dwukrotnie z każdym z testowanych szczepów, badanie prowadzono w niezależnych eksperymentach.

Oznaczanie lekooporności. Badanie lekooporności na antybiotyki badanych szczepów *P. aeruginosa* przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami EUCAST (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), <http://www.eucast.org/> (8). Jako szczep referencyjny użyto *P. aeruginosa* ATCC 27853. Kwalifikacji szczepów do kategorii MDR, XDR, PAN dokonano w oparciu o definicje według *Magiorakos* i inni (15).

Metody fenotypowe wykrywania β-laktamaz typu ESβL, MBL, KPC. Do wykrywania karbapenemaz typu ESβL (ang. *Extended-Spectrum β-Lactamases*) wykorzystano wstępny test dwóch krążków DDST (ang. *Double Disk Synergy Test*) w oparciu o kryteria *Giske* i inni (9). U izolatów niewrażliwych (średniowrażliwych lub opornych) na karbapenemy (imipenem, meropenem, doripenem) wykonano wstępne testy fenotypowe na obecność karbapenemaz typu MBL (ang. *Metallo-β-Lactamases*) (13) oraz typu KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (7). Jako szczep referencyjny użyto *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Izolacja DNA, amplifikacja i detekcja. Izolację DNA bakteryjnego przeprowadzono za pomocą zestawu Genomic Mini Purification Kit (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją producenta. Wszystkie badane próbki amplifikowano przy użyciu termocyklera Thermal Cycler T100™ (Bio-Rad). Rozdziału produktów amplifikacji dokonano w 1,5% żelu agarozowym (PRONA).

Detekcja genów kodujących wybrane β-laktamazy. Detekcję genów kodujących wybrane β-laktamazy włączając *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{PER}, *bla*_{SHV}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{VIM} przeprowadzono za pomocą reakcji PCR zgodnie z dostępną metodą (2,5,5,20,24,23). Wątpliwe produkty PCR poddano sekwencjonowaniu (Genomed). Analizy sekwencji dokonano z użyciem programu BLAST dostępnego na stronie internetowej NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Obecność genów kodujących wybrane czynniki wirulencji: *alkaliczną proteazę* (gen *aprA*); *elastazę B* (gen *lasB*); *egzotoksyny* (geny: *exoA*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*); *piocyaninę* (geny: *phzM*, *phzS*) potwierdzano na podstawie przeprowadzonych reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów (1,4,177).

Analiza profili restrykcyjnych. Analizę zmienności genetycznej badanych szczepów przeprowadzono za pomocą elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym PFGE (ang. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) po uprzednim trawieniu genomu bakteryjnego enzymem restrykcyjnym *SpeI* (Fermentas). Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym (Bio-Rad) przy użyciu zestawu CHEF DR® II (Bio-Rad) zgodnie z dostępnym protokołem (16). Fragmenty DNA w żelu wybarwiono bromkiem etydyny i oglądano w świetle UV przy użyciu systemu Gel Doc 2000 (Bio-Rad). Oprogramowania Gel Compar II®, BioNumerics wersja 6.5 (Applied Maths) użyto do konstrukcji dendrogramu (współczynnik Dice, UPGMA, optymalizacja 0,5%, tolerancja 1%).

WYNIKI

Określenie właściwości biochemicznych. Analiza właściwości biochemicznych wykazała, że wszystkie izolaty posiadały zdolność do wytwarzania oksydazy cytochromowej i L-dwuhydrolazy argininy - zarówno w warunkach tlenowych i beztlenowych, 56% izolatów syntetyzowało fluoresceinę, a 16,7% posiadało zdolność do produkcji plocjaniny.

Zakres aktywności litycznej. W teście ang. *host range* wykorzystano fagi o różnym spektrum aktywności litycznej (Tabela II). Bakteriofagi PAR_3; PAR_10 wykazywały najwyższą aktywność lityczną wobec izolatów *P. aeruginosa*, lizując 77,8% testowanych szczepów. Inne fagi, PAR_9 i PAR_8, wykazywały ogólnie słabszą aktywność przeciwko bakteriom, lizując odpowiednio 50% i 44,4% badanych izolatów. Pozostałe bakteriofagi wykazały wysoką siłę lityczną (55,5%-72,2%). W badanej puli szczepów-gospodarzy 22,2% wykazało wrażliwość na cały panel zastosowanych bakteriofagów, 1 szczep (5,5%) cechował najniższy stopień wrażliwości na testowane fagi.

Profile lekooporności. Wśród badanych izolatów *P. aeruginosa* zidentyfikowano 18 profili lekooporności. 16,7% opornych na ceftazydym i cefepim oraz 5,5% opornych na aztreonam oraz piperacylinę z tazobaktamem. Oporność na doripenem była niższa (16,7%) w stosunku do oporności na imipenem i meropenem, którą wykazało 22,2% szczepów. Wśród aminoglikozydów obserwowano najmniejszy odsetek szczepów opornych na amikacynę (16,7%) w porównaniu do odsetka szczepów opornych na gentamycynę, netilmycynę oraz tobramycynę (38,9%, 27,8% oraz 27,8%). Wśród fluorochinolonów, 44,4% izolatów było opornych na ciprofloksacynę oraz lewofloksacynę. Wszystkie badane izolaty wykazywały całkowitą oporność na tikarcylinę z kwasem klawulanowym. Nie stwierdzono izolatów opornych na kolistynę. Żaden z badanych szczepów nie wykazywał obecności β -laktamaz ESBL, MBL, KPC we wstępnych metodach fenotypowych. Zgodnie z *Magiorakos* i inni, 8 izolatów (44,4%) zostało zakwalifikowanych jako fenotyp MDR (15). W badanej kolekcji nie stwierdzono obecności szczepów o fenotypach XDR oraz PDR (Tabela III).

Tabela I. Charakterystyka izolatów klinicznych *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów.

Lp.	Symbol szczepu	Pochodzenie szczepu	Data izolacji szczepu	Miejsce pobrania materiału/ materiał badany	Rozpoznanie kliniczne
1.	P2920	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	22.09.2012 r.	rana/ wymaz	stan po operacji - kikut lewej kończyny dolnej
2.	P3448	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	14.12.2012 r.	rana/ wymaz	przetoka okolicy kolana lewego - stan po urazie
3.	16541	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Dr J. Bobra	25.06.2012 r.	ucho lewe/ wymaz	zapalenie ucha
4.	17478	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Dr J. Bobra	04.07.2012 r.	rana/ wymaz	rana powypadkowa, noga prawa
5.	22726	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Dr J. Bobra	17.09.2012 r.	rana podudzia prawego/ wymaz	stan po zmiążdżeniu podudzia i otwartym złamaniu
6.	18168	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Dr J. Bobra	12.07.2012 r.	ucho prawe i lewe/ wymaz	zapalenie ucha
7.	367/2013	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	10.01.2013 r.	plwocina	mukowisydoza
8.	12584	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Dr J. Bobra	20.06.2012 r.	ucho prawe/ wymaz	zapalenie ucha
9.	15412/2012	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	24.11.2012 r.	plwocina	mukowisydoza
10	15835/2012	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	30.11.2012 r.	plwocina	mukowisydoza
11.	P2145	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera	08.08.2012 r.	rana/ wymaz	owrzodzenie odleżynowe okolicy krzyżowej
12.	P2171	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	10.08.2012 r.	rana/ wymaz śródoperacyjny	endoproteza, rewizyjna stawu biodrowego lewego
13.	12	PROLAB Sp. z o. o. sp. komandytowa	17.05.2011 r.	owrzodzenie/ wymaz	owrzodzenie odleżynowe
14.	30/IG	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	28.11.2012 r.	plwocina	mukowisydoza
15.	P1799	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	03.07.2012 r.	rana/ wymaz	rak jelita grubego
16.	P2115	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	04.08.2012 r.	rana podudzia-powierzchnia przednia/ wymaz	rozeście rany pooperacyjnej
17.	P1815	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	04.07.20112 r.	rana/ wymaz	stan po laparotomii
18.	P2117	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	04.08.2012 r.	rana/ wymaz	otwarte złamanie podudzia

Tabela II. Wyniki testu ang. *host range* z klinicznymi izolatami *P. aeruginosa*, gospodarzami bakteriofagów.

Lp.	Symbol szczepu	Nr faga												
		PAR_1	PAR_2	PAR_3	PAR_4	PAR_5	PAR_6	PAR_7	PAR_8	PAR_9	PAR_10	PAR_11	PAR_12	
1.	P2920	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
2.	P3448	-	-	++	++	+	-	-	-	-	++	++	-	-
3.	16541	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	17478	-	-	++	-	-	-	+++	+++	-	-	++	++	-
5.	22726	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
6.	18168	++	++	++	++	++	++	-	+++	-	+++	+	+++	+++
7.	367/2013	+	++	-	-	+	-	++	++	-	-	-	-	-
8.	12584	++	++	++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
9.	15412/2012	-	++	-	-	+	-	++	++	-	-	-	+	-
10.	15835/2012	++	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	+	-	++
11.	P2145	++	+++	+++	+++	++	+++	++	-	-	-	++	++	+++
12.	P2171	-	-	++	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	-	-
13.	12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
14.	30/IG	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-	-
15.	P1799	+	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	-
16.	P2115	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	-
17.	P1815	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18.	P2117	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	-

Legenda: +++ szczepy mocno lizujące (> 30 lysinek fagowych); ++ szczepy słabo lizujące (20-30 lysinek fagowych); + szczep bardzo słabo lizujący (pojedyncze lysinki fagowe, <20); - szczepy nie lizujące (brak lysinek fagowych) wg *Postic* i inni [21].

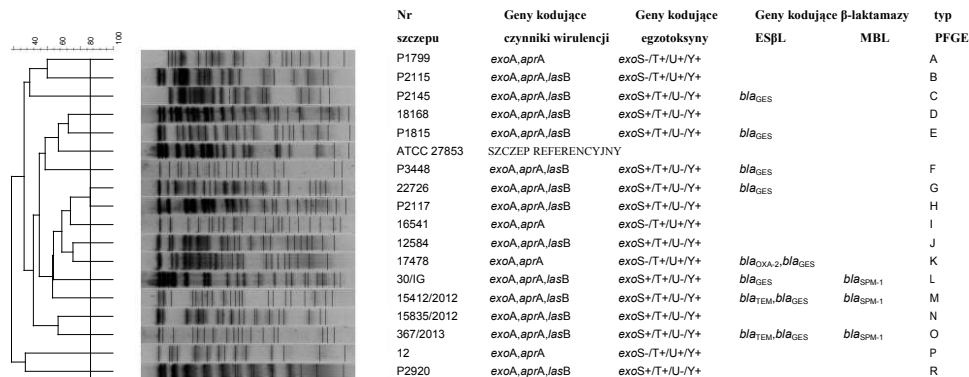
Tabela III. Wybrane antybiotyki wraz z odsetkiem izolatów *P. aeruginosa* opornych, wg Magiorakos i inni [15].

Antybiotyk	Liczba / odsetek izolatów opornych	
	n	%
Aminoglikozydy:		
Amikacyna	7	38,9
Gentamycyna	5	27,8
Netilmycyna	3	16,7
Tobramycyna	6	27,8
Karbapenemy:		
Imipenem	4	22,2
Doripenem	3	16,7
Meropenem	4	22,2
Cefalosporyny:		
Cefepim	3	16,7
Ceftazydym	3	16,7
Fluorochinolony:		
Ciprofloksacyna	8	44,4
Levofloksacyna	8	44,4
Penicyliny + inhibitory β-laktamaz:		
Piperacylina+tazobaktam	1	5,6
Tikarcylina+kwas klawulanowy	18	100
Monobaktamy:		
Aztreonam	1	5,6
Kolistyna	0	0
Polimyksyny	0	0

Geny kodujące β -laktamazy. W badanej grupie szczepów osiem izolatów (44,4%) posiadało gen bla_{GES} , natomiast gen bla_{TEM} wykryto u 2 izolatów (11,1%) (Ryc. 2). Obecność genu bla_{OXA-2} potwierdzono u 1 izolatu (5,5%). Współwystępowanie genów bla_{GES} i bla_{TEM} odnotowano u 2 izolatów (11,1%), natomiast bla_{GES} i bla_{OXA-2} u 1 izolatu (5,5%). Nie wykryto genów bla_{KPC} , bla_{OXA-10} , bla_{PER} , bla_{SHV} . Gen bla_{SPM-1} oznaczono u 3 izolatów (16,7%) całkowicie opornych na karbapenemy. Nie wykazano szczepów z genami bla_{IMP} , bla_{VIM} . Współwystępowanie genów bla_{SPM-1} oraz bla_{GES} potwierdzono u 3 izolatów (16,7%) z kolei bla_{SPM-1} i bla_{TEM} u 1 izolatu (5,5%). Dwa szczepy (11,1%) posiadały równocześnie geny bla_{GES} , bla_{SPM-1} , bla_{TEM} .

Geny kodujące wybrane czynniki wirulencji. Występowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u poszczególnych izolatów przedstawiono na Ryc. 1. Wszystkie badane szczepy posiadały gen $aprA$, $phzM$, $phzS$, 14 izolatów (77,8%) posiadało dodatkowo gen $lasB$. Obecność genu $exoA$ kodującego egzotoksynę A oraz genu $exoT$ kodującego egzoenzym T potwierdzono u wszystkich analizowanych szczepów, gen $exoY$ był obecny u 17 izolatów (94,4%), gen $exoS$ u 15 izolatów (83,3%), zaś gen $exoU$ u 4 izolatów (22,2%). Wśród genów kodujących egzotoksyny (S,T,U,Y) najczęściej zaobserwowanym układem było występowanie genów $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$ (77,8%, 14 izolatów), $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$ (11,1%, 2 izolaty), $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$ (5,5%, 1 izolat) oraz $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$ (5,5%, 1 izolat).

Analiza profili restrykcyjnych. Wykazano duże zróżnicowanie klonalne badanej kolekcji szczepów *P. aeruginosa*. Stosując metodę PFGE dla 18 badanych izolatów uzyskano 18 unikalnych wzorów genetycznych (pulsotypów) oznaczonych kolejno literami (A-S) (Ryc. 1). Zgodnie z przyjętymi kryteriami (pkt. odcięcia 80% podobieństwa) wszystkie szczepy zostały zidentyfikowane jako odmienne genetycznie. Przeprowadzona analiza nie wykazała związku pomiędzy uzyskanymi pulsotypami PFGE a profilami lekooporności, kombinacją genów kodujących egzotoksyny czy występowaniem genów kodujących β -laktamazy.



Ryc. 1. Analiza makrorestrykcyjna chromosomalnego DNA izolatów *P. aeruginosa*, bakterii-gospodarzy bakteriofagów, po trawieniu enzymem restrykcyjnym *SpeI*, wykreślona z użyciem programu Gel Compar® II (Applied Maths).

DYSKUSJA

Materiał genetyczny niesiony przez bakteriofagi stanowi ważny dla *P. aeruginosa* depozyt informacji genetycznej. Międzykomórkowy transfer informacji genetycznej za pośrednictwem bakteriofagów na drodze transdukcji umożliwia *P. aeruginosa* wzbogacenie puli genów o dodatkową informację genetyczną pochodzącą często od niespokrewnionych taksonomicznie gatunków bakterii. Dlatego tak ważne jest tworzenie i stałe wzbogacanie kolekcji w nowe posiadające pożądane cechy, dobrze zdefiniowane szczepy co pozwoli na skuteczne monitorowanie zmian w populacjach mikroorganizmów.

Głównym wymaganiam stawianym bakteriofagom do terapii jest potwierdzenie ich natury litycznej (wirulentnej). Z punktu widzenia selekcji fagów o potencjale terapeutycznym w warunkach *in vitro* ważne jest określenie zakresu aktywności litycznej czyli zdolności do lizowania izolatów klinicznych, za dobre uznaje się wyniki rzędu 15-30% zlizowanych szczepów. Procent szczepów zlizowanych przez danego faga zależy w dużej mierze od kolekcji bakterii, gospodarzy fagów. Użyte w przeprowadzonej analizie izolaty kliniczne *P. aeruginosa* cechowały się różnym stopniem wrażliwości na badane fagi ale gwarantowały ich szerokie spektrum lityczne (44,4%-77,8%). Podobne działania nad określeniem zakresu litycznego fagów p/*P. aeruginosa* zostały przeprowadzone przez inny zespół badawczy (12). W zaprezentowanej pracy wykazano duże zróżnicowanie pod względem lekooporności badanej kolekcji szczepów *P. aeruginosa*. Nie odnotowa-

no szczepów opornych na kolistynę, co jest zgodne z danymi literaturowymi z Brazyli, Francji i Kanady potwierdzającymi 100% wrażliwość pałeczek *P. aeruginosa* na kolistynę (20,22,25). W naszych badaniach wszystkie szczepy były odporne na tikarcylinę z kwasem klawulanowym, z kolei oporność na piperacylinę z tazobaktamem wykazał zaledwie 1 szczep (5,5%). Możliwe wytłumaczenie podają *Lister* i inni, analizując wpływ kwasu klawulanowego na obniżenie aktywności przeciwbakteryjnej tikarcyliny (14). W badaniu 44,4% izolatów zaklasyfikowano jako MDR. Podobny odsetek (54,5%) szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie MDR przedstawili w swoich pracach *Peña* i inni, podkreślając, że szczepy te stanowią powszechny problem kliniczny (18). Wśród analizowanych szczepów 11,1% posiadało gen bla_{TEM} , nie stwierdzono natomiast żadnego szczepu posiadającego gen bla_{SHV} . Otrzymane wyniki są porównywalne z wynikami z Francji czy Szwajcarii, w których autorzy potwierdzają niezwykle rzadkie występowanie β -laktamaz typu TEM i SHV u *P. aeruginosa*, (24). Obecność genu bla_{OXA-2} kodującego OXA, inną β -laktamazą ESBL potwierdzono u 1 izolatu opornego na piperacylinę. Według *Bert* i inni, klasyczne enzymy OXA w pewnym stopniu hydrolizują ureidopenicyliny (piperacylina) nadając tym samym szczepom oporność na te leki (5). W przedstawionej pracy odnotowaliśmy również 8 (44,4%) izolatów posiadających gen bla_{GES} . Wyniki te potwierdzają dane literaturowe wskazujące, że β -laktamazy typu GES u *P. aeruginosa* są coraz częściej wykrywane w licznych państwach europejskich (22,24,25).

Głównymi mechanizmami oporności na karbapenemy szczepów z badanej kolekcji było wytwarzanie β -laktamaz typu MBL, co potwierdzono wykryciem genów je kodujących. Nie wykryto genów bla_{VIM} i bla_{IMP} choć ich występowanie obserwuje się na całym świecie co zostało opisane w dostępnej literaturze naukowej (22). U trzech izolatów (16,7%) wykazano obecność genu bla_{SPM-1} . Po raz pierwszy szczep *P. aeruginosa* produkujący β -laktamazę typu SPM-1 opisano w Brazylii w 1997 roku (23), aktualnie szczepy te są coraz bardziej rozpowszechnione także w Europie (22). Prezentowane badania sugerują bliskie pokrewieństwo genetyczne pomiędzy izolatami $bla_{SPM-1}(+)$ co podkreślają także wcześniejsze doświadczenia (20), natomiast zbyt mała liczba badanych szczepów w kolekcji nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie tej obserwacji.

Egzotoksyny (S,T,U,Y) to białka efektorowe systemu III sekrecji (T3SS) ułatwiające rozwój i progresję zakażenia bakteryjnego. *Peña* C i inni wykazali, że izolaty kliniczne *P. aeruginosa* rzadziej uwalniają egzotoksyny pojedynczo sugerując, że częściej są one uwalniane w specyficznych połączeniach (17). W naszym badaniu zdecydowana większość szczepów (98%) uwalnia egzotoksynę T oraz egzotoksynę Y (95%). W cytowanej publikacji szczególną uwagę zwrócono na izolaty posiadające równocześnie geny kodujące $exoU/S$, gdzie $exoU^+/S^+$ (75%), $exoU^+/S^-$ (21%), $exoU^-/S^+$ (21%) $exoU^+/S^+$ (0,5%). W przedstawionej pracy trzynaście izolatów (78%) prezentowało genotyp $exoU^+/S^+$, z kolei genotyp $exoU^+/S^-$ potwierdzono u 28% badanych szczepów. Uzyskane wyniki pokrywają się z danymi opublikowanymi przez brytyjskie i hiszpańskie grupy badawcze, gdzie częstość wykrywania genu $exoS^+$ wahała się w granicach pomiędzy 69%-75%, natomiast gen $exoU^+$ wykrywano u 21%-25,4% szczepów *P. aeruginosa* (17). Analizując wyniki przeprowadzonych badań nie znaleziono zależności pomiędzy występowaniem genu $exoU^+$ a opornością na cefalosporyny, karbapenemy i fluorochinolony, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (17).

Badania wykazały dużą zmienność genetyczną w obrębie badanej grupy szczepów,

potwierdzając nieklonalną strukturę globalnej populacji *P. aeruginosa*, zagadnienie to jest szeroko dyskutowane przez inne zespoły badawcze (3,19). Nie znaleziono żadnej zależności pomiędzy profilami lekooporności, występowaniem genów kodujących wybrane czynniki zjadliwości a pulsotypami oznaczonymi przy zastosowaniu metody PFGE.

Podsumowując, celem pracy było przeprowadzenie charakterystyki szczepów z gatunku *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów z zastosowaniem metod fenotypowych i molekularnych. Zaprezentowane izolaty kliniczne *P. aeruginosa* tworzą kolekcję mikrobiologiczną szczepów licencjonowanych i stanowią pulę macierzystą (ang. *Master Seed Lot*) do namnażania bakteriofagów o wysokim potencjale technologicznym oraz terapeutycznym do zwalczania zakażeń o etiologii *P. aeruginosa*, w tym szczepów wielolekoopornych.

Prezentowana praca była realizowana w ramach projektu o akronimie ONKOFAG pt. „Rozwój fagoterapii w leczeniu antybiotykoopornych zakażeń, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów onkologicznych” (umowa nr INNOMED/I/4/NCBR/2014) i finansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Podziękowania za współpracę dla Zespołu BIOMED S.A. w Krakowie, w szczególności dla mgr Marty Borodawko i mgr Agnieszki Serwinowskiej. Szczególne podziękowania dla mgr Anny Małskiej-Woźniak z Katedry Mikrobiologii UJ CM za pomoc przy metodzie PFGE.

PIŚMIENNICTWO

1. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T i inni. Single-Nucleotide-Polymorphism Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion Toxins for Development of a Diagnostic Multiplex PCR System. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3526–31.
2. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN i inni. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2670–1.
3. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *Int J Biol* 2015; 7: 44–67.
4. Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Janczarek M i inni. Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim Pol* 2013; 60: 83–90.
5. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrobial Chemother* 2002; 50: 11–8.
6. Bush K, George A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *AAC* 2010; 969-976.
7. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM i inni. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4083–6.
8. EUCAST v. 4.0 2014. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 40, 2014. 2014; 0–79.

9. Giske CG, Martinez L, Cantòn R i inni. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2013; (December): 1–40.
10. Klockgether J, Wu D, Wiehlmann L. Transcript profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* genomic islands PAGI-2 and pKLC102. *Microbiology* 2008; 154: 1599–604.
11. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 621–41.
12. Kwiatek M, Mizak L, Parasion S i inni. Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Folia Microbiol* 2014; 60: 7–14.
13. Lee K, Lim YS, Yong D i inni. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4623–9.
14. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrobial Agents Chemother* 1999; 43: 882–9.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i inni. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection. Eur Soc of Clin Infect Dis*; 2012; 18: 268–81.
16. Mar Blanco M, Gibello A, Vela AI i inni. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Organ* 2002; 50: 19–27.
17. Nowroozi J, Akhavan Sepahi A, Rashnonejad A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. *Cell Journal* 2012; 14: 7–18.
18. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S i inni. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 539–48.
19. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B i inni. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE*. 2009; 4: e7740.
20. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG i inni. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla* CTX-M-2, *bla* GES-1 and *bla* GES-5, *bla* IMP-1 and *bla* SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Inf D Dis* 2012; 12: 176.
21. Postic B, Finland M. 1961 Observations on bacteriophage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *JCI* 1961; 40: 2064-75.
22. Potron A, Poirrel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrobial Agents Elsevier B.V.*; 2015; 45: 568–85.
23. Salabi A El, Toleman M a, Weeks J i inni. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrobial Agents Chemother* 2010; 54: 582.

24. *Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.* Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact MINIREVIEW Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003; 47: 2385–92.
25. *Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B* i inni. Phenotypic Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* Population in a Cystic Fibrosis Patient. *PLoS ONE*. 2013; 8: 1-10.

Otrzymano: 1 II 2018 r.

Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysza 18, Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Chorobotwórczość *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
w świetle ostatnich badań

Pathogenicity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
in the light of recent research

Jan Kowalski

Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* jest bakterią powszechnie związaną z agresywnym zapaleniem przyzębia. W pracy omówiono serotypy patogenu i potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za przyspieszone niszczenie tkanek przyzębia.**

Słowa kluczowe: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, czynniki wirulencji, agresywne zapalenie przyzębia

ABSTRACT

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is commonly tied with aggressive periodontitis. Paper describes pathogen's serotypes and potential mechanisms responsible for the accelerated periodontal tissue destruction.**

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, virulence factors, aggressive periodontitis

WSTĘP

Aggregatibacter actinomycetemcomitans jest patogenem związanym z agresywnym zapaleniem przyzębia. Ta jednostka chorobowa została ujęta w obowiązującej do dzisiaj klasyfikacji AAP z 1999 roku. Jakkolwiek niemal pewnym jest, że w momencie publikacji tego artykułu klasyfikacja już uległa zmianie na nową (powstała we współpracy EFP i AAP, ustaloną w Chicago w listopadzie 2017 roku, a nowa klasyfikacja prawdopodobnie nie będzie uwzględniała rozpoznania „agresywne zapalenie przyzębia”), to należy pamiętać, że zmiana nomenklatury nie spowoduje zmiany w patogenności bakterii. *A.actinomycetemcomitans* cały czas będzie kojarzony z zapaleniem przyzębia, nasilo-

nym przy siekaczach przyśrodkowych i pierwszych zębach trzonowych. Podobnie jak we wcześniejszych klasyfikacjach, występowanie tego drobnoustroju korelowało z młodzieńczym zapaleniem przyzębia, w mniejszym stopniu z gwałtownie postępującym zapaleniem przyzębia czy też – jeszcze wcześniej – z *periodontitis gravis et complicata* lub desmodontozą. Odpowiedzialny za to jest bowiem szczególnie fenotyp tej bakterii.

Klasyfikacja tej bakterii na przestrzeni ostatnich stu lat ulegała zmianie trzykrotnie. W 1929 roku została przemianowana na *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, w latach 80-tych przekwalifikowana na *Haemophilus actinomycetemcomitans* (36). W roku 2006 taksonomia uległa kolejnej zmianie i ostatecznie ustalono nazwę na używaną obecnie (34). Jest to Gram-ujemna, nieruchoma pałeczka względnie beztlenowa, jak wskazuje nazwa, towarzysząca promieniowcom, należąca do rodziny *Pasteurellaceae*. Dyskusyjny jest podział typów tej bakterii. Pierwotnie bakterię typowano zależnie od potencjału leukotoksycznego na bakterie o niskiej lub wysokiej zdolności eliminacji leukocytów (odpowiednio genotypy non-JP2 i JP2) (44). Zespół prof. *Slots*a ustalił inny podział - na podstawie budowy polisacharydów błonowych (*A.actinomycetemcomitans* wykryto u 85 pacjentów z ponad 400 osobowej grupy badanej) wydzielono sześć podstawowych serotypów tego patogenu, z czego najczęściej w jamie ustnej występują trzy, oznaczone literami a, b oraz c (48). Wg badania *Perry'ego* i wsp. (35) serotypy a i b w niemal równej proporcji są oznaczane u osób zdrowych i z przewlekłym zapaleniem przyzębia (wówczas określanym jako zapalenie przyzębia dorosłych), serotyp b występuje jednakże niemal dwukrotnie częściej w agresywnym zapaleniu przyzębia (wówczas młodzieńczym zapaleniu przyzębia), serotyp c pojawia się rzadziej, w równych proporcjach, i odpowiada przede wszystkim za infekcje poza jamą ustną. Najczęstszymi takimi zakażeniami są ropnie mózgu oraz zapalenie kości i zapalenie wsierdzia (37), natomiast według *Zambona* i wsp. (4) pałeczki serotypu c znajdowane są u osób zdrowych. Pałeczki *A.actinomycetemcomitans* należące do serotypów d i e występują na tyle rzadko, że ich właściwości nie są scharakteryzowane (35). Według badania *Socransky'ego* i wsp. (43) serotyp a *A.actinomycetemcomitans* wraz z *Eikenella corrodens* tworzy zielony kompleks bakteryjny, podczas gdy serotyp b pałeczek *A.actinomycetemcomitans* nie mógł być przyporządkowany do żadnego z kompleksów. Wykazano co prawda, że serotyp b, nawet z genotypem non-JP2, jest silnie leukotoksyczny jednakże podział JP2/non-JP2 jest mocno zakorzeniony i do chwili obecnej stosowany w mikrobiologii przyzębia (13). Według *Hoglund-Aberg* i wsp. (14) serotyp b jest praktycznie tożsamy z genotypem JP2. Pacjenci z reguły ulegają infekcji jednym z serotypów patogenu i nie zmienia się to w trakcie trwania choroby (39).

Niezależnie od serotypu pałeczek, podobnie jak w przypadku innych patogenów powodujących choroby przyzębia, wykazano duże różnice fenotypowe pomiędzy formą planktonową, obecną w jamie ustnej osób ze zdrowym przyzęciem, a formą biofilmową. Spośród 78 przebadanych protein, w przypadku 37 stwierdzono obniżenie, a w przypadku 13 zwiększenie ekspresji po wzroście w biofilmie. Większość tych ostatnich było białkami błony komórkowej oraz proteinami posiadającymi charakter immunogeny (26).

MECHANIZMY KOLONIZACJI

A.actinomycetemcomitans przejawia wiele form interakcji z komórkami gospodarza, począwszy od specyficznych mechanizmów kolonizacyjnych i obronnych, a skończywszy

na szerokim spektrum toksyn. Udowodniono zdolność patogenu do łączenia się z ludzkimi komórkami nabłonkowymi (30). Za zdolność kolonizacji tej bakterii w dużym stopniu odpowiadają fimbrie. *A. actinomycetemcomitans* może występować w kilku postaciach, określanych na podstawie obrazu mikroskopowego jako przezroczyste szorstkie, przezroczyste gładkie i nieprzezroczyste gładkie, z czego jedynie pierwsze wymienione są ufimbriowane (16). Przeciwciała skierowane przeciwko tym fimbriom blokowały adhezję bakterii do sztucznych powierzchni, komórek nabłonkowych policzka i do fibroblastów (9). Wykazano, że za łączenie bakterii z błoną śluzową policzków odpowiadają przede wszystkim adhezyny ApiA i Aae (4). Ta ostatnia jest homologiem Hap, analogicznej proteiny obecnej u *H. influenzae* i odpowiedzialnej za jej inwazyjność. Jest tak zwanym autotransporterem, czyli białkiem promującym własne przeniesienie z cytoplazmy bakterii na jej powierzchnię (38). Oprócz wymienionych, w adhezji *A. actinomycetemcomitans* uczestniczą inne proteiny, jak choćby Omp100, która wydaje się pełnić rolę w przyleganiu do keratynocytów (1). Bakterie pozbawione genów kodujących Aae i Omp100 były całkowicie niezdolne do łączenia się z komórkami nabłonkowymi policzka (47). Za zdolność do inwazji w głąb tkanek odpowiadają adhezyny nie powiązane z fimbriami. Jedną z nich jest glikoproteina, będąca receptorem dla fibronektyny, która po połączeniu z bakterią łączy się z integryną na powierzchni komórki gospodarza umożliwiając endocytozę. Według obserwacji mikroskopowej dochodzi do niej w około 30 minut. Niemal natychmiast po wnikięciu drobnoustrojów, komórki gospodarza zaczynają się dzielić oraz tworzyć, zawierające bakterie, wypustki cytoplazmatyczne (protruzje), łączące się z sąsiednimi komórkami (31). Zjawisko to, pierwotnie przypisywane unikalnie *A. actinomycetemcomitans*, okazuje się być powszechne dla mikrobioty jamy ustnej. Nie jest jasna rola tego zjawiska dla bakterii, które z jednej strony chronione są w ten sposób przed antybiotykami i mechanizmami obrony immunologicznej, z drugiej mogą indukować apoptozę lub stać się obiektem działania mechanizmów obrony wewnątrzkomórkowej (11). Co ciekawe, znacznie efektywniejsze we wnikanii do komórek gospodarza okazały się być gładkie postacie pałeczek *A. actinomycetemcomitans* niż szorstkie (29). Niezależnie od tego, w wyniku połączenia z keratynocytami dochodzi do zmian fenotypowych w komórce docelowej, przejawiających się m.in. w modyfikacji ekspresji genów odpowiedzialnych za apoptozę (27). Kolejnym receptorem wiążącym jest obecny na komórkach gospodarza receptor dla czynnika aktywującego płytki krwi, który wiąże się z bakterią poprzez fosforylcholinę obecną na jej powierzchni. Komórkami gospodarza mogą być komórki śródbłonna naczyń i postuluje się, że to jest droga przenikania *A. actinomycetemcomitans* do krwiobiegu (40).

A. actinomycetemcomitans przejawia dodatkowo zdolność do łączenia się z kolagenem typu I, dominującym w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych w tkankach przyzębia. Interesujący jest fakt, że wykazano szczególnie silne wiązanie pałeczek *A. actinomycetemcomitans* z kolagenem typu V, którego ilość w tkankach dziąsła w trakcie trwania reakcji zapalnej wzrasta 9-krotnie. Przy jednoczesnej ogólnej degradacji kolagenu w wyniku procesu chorobowego może to mieć znaczenie w inwazyjności *A. actinomycetemcomitans*. Powinowactwo bakterii do kolagenu dotyczy tylko ustrukturyzowanej formy, nie stwierdzono zjawiska nasilonego łączenia z kolagenem w formie rozpuszczalnej (32).

Podstawową, pierwotną formą biernej obrony jest tworzenie bakteryjnej matrycy zewnątrzkomórkowej z egzopolisacharydu. *A. actinomycetemcomitans* wytwarza poli-N-

-acyetylo-glukozaminę (PGA), zbliżoną w budowie do PGA *E.coli*, *S. aureus* i *S. epidermidis* (21). W badaniu przeprowadzonym na szczurach dowiedziono, że szczepy *A.actinomycescomitans* pozbawione zdolności wytwarzania PGA wykazywały mniejszą przeżywalność niż pozostałe szczepy (41). PGA odgrywa również niebagatelną rolę w adhezji bakterii do komórek gospodarza (17). Za hipotezę o roli PGA w adhezji do tkanek twardych przemawia obserwacja, że *A.actinomycescomitans* wykazuje zdolność kolonizacji z błony śluzowej policzka na tkanki twarde, lecz nie w sekwencji odwrotnej (15). Niewykluczone, że syntezowanie PGA jest niezbędne do zainicjowania chorobotwórczości *A.actinomycescomitans*. W badaniu na szczurach wykazano, że szczep bakteryjny pozbawiony zdolności syntezy PGA nie inicjował resorpcji (8). Należy wyjaśnić, czy to jednostkowo zaobserwowany fenomen czy reguła, oraz czy nieinicjowanie resorpcji wynika po prostu z niezdolności do kolonizacji, czy też z jakiegoś procesu kaskadowego, w który PGA byłby zaangażowany.

MECHANIZMY ZJADLIWOŚCI

A.actinomycescomitans, podobnie jak wiele innych bakterii tworzących biofilm, konkuruje z innymi gatunkami wydzielając bakteriocyny. Są nimi aktynobacylina i aktynomycetekomityna działające odpowiednio na *Streptococcus sanguis* i *Peptostreptococcus anaerobius* (8,25). Poprzez selektywne hamowanie wzrostu tych konkretnych gatunków bakteryjnych stwarza się nisza ekologiczna w strukturze biofilmu i przestrzeni kieszonki do dalszego wzrostu patogenu.

Po kolonizacji, *A.actinomycescomitans* pobudza układ immunologiczny do reakcji. Pierwotnie dzieje się to na dwa sposoby. Po pierwsze, *A.actinomycescomitans* stymuluje komórki nabłonkowe dziąsła do produkcji IL-8 i ICAM-1, które są bardzo silnymi chemoatraktantami dla neutrofilów. Według badania autorów japońskich, serotyp b *A.actinomycescomitans* (a konkretnie jedna z linii komórkowych tego serotypu) szczególnie silnie wpływa na komórki dziąsłowe w warunkach *in vitro*, stymulując ekspresję IL-8 i ICAM-1. Pozostałe linie komórkowe oddziaływały w sposób śladowy (42). Po drugie, działanie chemoatrakcyjne wykazuje lipopolisacharyd bakterii, biorąc udział w zjawisku wzmożonego pobudzenia osteoklastów. Dynamika utraty kości w przebiegu zapalenia przyzębia powiązana jest, poprzez aktywację limfocytów Th₁₇, z wewnątrzkomórkową ligandą aktywatora receptora nfkappaB (RANKL) mobilizującą osteoklasty (45). Wykazano, że lipopolisacharyd serotypu b *A.actinomycescomitans* szczególnie silnie aktywuje ekspresję genów różnicujących komórki T do subpopulacji Th₁₇, co może prowadzić do nasilonej aktywności resorpcyjnej osteoklastów, a w konsekwencji do agresywniejszego przebiegu zapalenia przyzębia (3). Lipopolisacharyd ten szczególnie silnie aktywuje komórki Langerhansa, prowadząc z kolei do różnicowania i aktywacji Th₁₇ oraz sekrecji powiązanych z tą linią komórkową cytokin prozapalnych, jak IL-6, IL-17 i IL-21, a także produkcji RANKL i nadmiernej aktywacji osteoklastów (28).

Podstawowymi dwiema cytotoksynami produkowanymi i wydzielanymi przez pałeczki *A. actinomycescomitans* są genotoksyna CDT (CDT) i leukotoksyna A (LtxA). Genotoksyna CDT, wydzielana przez niektóre bakterie Gram-ujemne, powoduje śmierć komórek gospodarza poprzez zahamowanie ich proliferacji w fazie G₂ cyklu komórkowego i zwiększenie ekspresji RANKL, co, jak już wspomniano wcześniej, stymuluje osteo-

klasty i prowadzi do apoptozy komórki (15). Genotoksyna przenika przez błonę komórki łącząc się prawdopodobnie z cholesterolem, następnie poprzez aparat Golgiego i retikulum endoplazmatyczne dociera do jądra komórkowego (7). Genotoksyna CDT ze względu na zdolność blokowania cyklu komórkowego znajduje się pod szczególną uwagą lekarzy onkologów. Wykazano jej związek z dysplazją komórek wątroby u myszy i sugeruje się związek pomiędzy występowaniem dysplazji w jamie ustnej a infekcją szczepami bakteryjnymi zdolnymi do produkcji CDT (6). LtxA powoduje z kolei tworzenie porów w błonie leukocytów i lizę tych komórek (15). Dodatkowo, bierze udział w degranulacji neutrofilów i odpowiedzi prozapalnej makrofagów, co dodatkowo nasila komponentę nieswoistą odpowiedzi immunologicznej (19). LtxA należy do grupy toksyn bakteryjnych RTX, do których zaliczana jest również hemolizyna *E. coli*. Wyjątkowość LtxA polega na zdolności do modyfikowania cech bakterii. Leukotoksyna gromadzona jest w specjalnych pęcherzykach i na powierzchni błony komórkowej (22). Wykazano, że zjawisko to zachodzi u szorstkiej postaci pałeczek *A. actinomycetemcomitans*. Z kolei postaci gładkie (w tym genotyp JP2) produkują i wydzielają duże ilości tej toksyny, bez jej wiązania na powierzchni błony komórkowej. Co interesujące, mutacje genu *tad* współodpowiedzialnego za tworzenie fimbrii, które powodowały utratę zdolności adhezji, skutkowały także uwalnianiem LtxA (20). Docelowym receptorem dla LtxA jest heterodimer LFA-1 (CD11/CD18) na powierzchni neutrofilów (24). Połączenie z receptorem LFA-1 indukuje sekrecję zewnątrzkomórkowego ATP, który – obok klasycznego antygeny – jest współodpowiedzialny za aktywację kompleksu inflamasomu i aktywowanie oraz wydzielanie interleukiny-1 oraz interelukiny-18 (33). W związku z tym wydaje się, że główne działanie LtxA nie tyle jest powiązane ze śmiercią komórek immunokompetentnych, w szczególności makrofagów, ale z towarzyszącym jej wyrzutem cytokin prozapalnych i wzmoczoną aktywnością osteoklastyczną. Istnieje hipoteza, według której makrofagi poddane działaniu LtxA ulegają specyficznemu rodzajowi śmierci komórkowej nazywanemu pyroptożą. Komórki ulegające pyroptozi zwiększają swoją objętość, ponieważ w wyniku powstania porów transbłonowych dochodzi do zmian ciśnienia osmotycznego, wsączenia wody do komórki, obrzęku komórki i wydzielania IL-1 i IL-18 (5). W wyniku pyroptozy dochodzi także do aktywacji kaspazy-1, składowej kompleksu inflamasomu (23). Wpływ LtxA na występowanie agresywnego zapalenia przyzębia jest udokumentowany, według *Haubeka* i wsp. (10) osoby z kieszonkami zainfekowanymi genotypem JP2 miały 18-krotnie większe ryzyko wystąpienia agresywnego zapalenia przyzębia niż osoby zainfekowane genotypem non-JP2. LtxA wzmacnia wydzielanie i tworzenie zewnątrzkomórkowej sieci DNA tworzonej przez neutrofile (z ang. neutrophil extracellular trap, NET). NET oprócz niszczenia bakterii obecności powiązanych z DNA protein i peptydów przeciwbakteryjnych, dodatkowo wzmacnia komponentę nieswoistą odpowiedzi zapalnej, a w konsekwencji nasila destrukcję zapalną tkanek przyzębia. Jest to możliwe, ponieważ liza neutrofilów wynikająca z działania leukotoksyny jest zjawiskiem stosunkowo powolnym, co umożliwia komórce docelowej na wcześniejsze wytworzenie NET. Z tego powodu w przestrzeni międzykomórkowej, oprócz uporządkowanego DNA obecnego w NET, stwierdza się także chaotycznie występujące strzępki DNA wynikłego z lizy komórek. Ten fragmentowany DNA jest silnym czynnikiem chemoatrakcyjnym, co powoduje migrację kolejnych neutrofilów i – w obecności bakterii *A. a.* produkującego leukotoksynę – może prowadzić do błędnego koła nasilonej destrukcji tkanki łącznej i kości (12).

PODSUMOWANIE

Coraz więcej dowodów wydaje się wskazywać na to, że *A.actinomycetemcomitans* ma wpływ na zapoczątkowanie zapalenia przyzębia, natomiast w późniejszych stadiach choroby biofilm ulega silnej dywersyfikacji gatunkowej (2). *A.actinomycetemcomitans* dzięki licznym swoistym mechanizmom kolonizacji zasiedla efektywnie szczelinę dziąsłową, natomiast po zainicjowaniu destrukcji tkanek i powstaniu kieszonki przyzębnej stwarza warunki dla bakterii konkurujących. Takim patogenem jest *P.gingivalis*. Udowodniono, że posiada on zdolność obniżenia aktywności LtxA (18), a dzięki wydzielaniu gingipainy posiada zdolność hamowania kolonizacji i namnażania *A.actinomycetemcomitans* (46). Wydaje się jednak, że rola *A.actinomycetemcomitans* w zapoczątkowaniu nasilonego procesu chorobowego jest tak znacząca, że zasadne jest skupienie uwagi na tej bakterii w kontekście profilaktyki i leczenia zapalenia przyzębia pojawiającego się u młodzieży, obejmującego wcześniej wyrżnięte uzębienie stałe.

PIŚMIENNICTWO

1. Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S i inni. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* 2003; 50: 1125 – 39.
2. Dahlen G, Claesson R, Aberg CH, Haubek D i inni. Subgingival bacteria in Ghanaian adolescents with or without progression of attachment loss. *J Oral Microbiol* 2014; 6; PMID:24834145; <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v6.23977>.
3. Diaz-Zuniga J, Yanez JP, Alvarez C, Melgar-Rodriguez S i inni. Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 242 – 51.
4. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Vellyagounder K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an early colonizer of oral tissues: epithelium as a reservoir? *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4464 – 73.
5. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* 2005; 73: 1907 – 16.
6. Ge Z, Rogers AB, Feng Y, Lee A i inni. Bacterial cytolethal distending toxin promotes the development of dysplasia in a model of microbially induced hepatocarcinogenesis. *Cell Microbiol* 2007; 9: 2070 – 80.
7. Guerra L, Teter K, Lilley BN, Stenerlow B i inni. Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol* 2005; 7: 921 – 34.
8. Hammond BF, Lillard SE, Stevens RH. A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1987; 55: 686 – 91.
9. Harano K, Yamanaka A, Okuda K. An antiserum to a synthetic fimbrial peptide of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* blocked adhesion of the microorganism. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 130: 279 – 85.
10. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M i inni. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008; 371: 237 – 42.

11. *Henderson B, Ward JM, Ready D*. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A* periopathogen? *Periodontology* 2000 2010; 54: 78 – 105.
12. *Hirschfeld J, Roberts HM, Chapple IL, Parcina M* i inni. Effects of Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin on neutrophil migration and extracellular trap formation. *J Oral Microbiol* 2016; 8: 33070.
13. *Hoglund Aberg C, Haubek D, Kwamin F, Johansson A* i inni. Leukotoxic activity of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and periodontal attachment loss. *PLoS One* 2014; 9: e104095.
14. *Hoglund Aberg C, Kwamin F, Claesson R, Dahlen G* i inni. Progression of attachment loss is strongly associated with presence of the JP2 genotype of Aggregatibacter actinomycetemcomitans: a prospective cohort study of a young adolescent population. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 232 – 41.
15. *Hoglund Aberg C, Kelk P, Johansson A*. Aggregatibacter actinomycetemcomitans : Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence* 2015; 6: 188 – 95.
16. *Inouye T, Ohta H, Kokeyuchi S, Fukui K* i inni. Colonial variation and fimbriation of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 57: 13 – 7.
17. *Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB*. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 470 – 6.
18. *Johansson A, Hanstrom L, Kalfas S*. Inhibition of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxicity by bacteria from the subgingival flora. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 218 – 25.
19. *Johansson A*. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. *Toxins* 2011; 3: 242 – 59.
20. *Kachlany SC, Fine DH, Figurski DH*. Secretion of RTX leukotoxin by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun* 2000; 68: 6094 –100.
21. *Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H* i inni. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in Actinobacillus actinomycetemcomitans and Actinobacillus pleuropneumoniae biofilms. *J Bacteriol* 2004; 186: 8213 – 20.
22. *Kato S, Kowashi Y, Demuth DR*. Outer membrane-like vesicles secreted by Actinobacillus actinomycetemcomitans are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* 2002; 32: 1 – 13.
23. *Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J* i inni. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3 – 11.
24. *Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL* i inni. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 30463 – 9.
25. *Lima FL, de Carvalho MA, Apolonio AC, Bemquerer MP* i inni. Actinomycetemcomitin: a new bacteriocin produced by Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35: 103 – 10.
26. *Llama-Palacios A, Potupa O, Sanchez MC, Figuero E* i inni. Aggregatibacter actinomycetemcomitans growth in biofilm versus planktonic state: differential expression of proteins. *J Proteome Res* 2017; 16: 3158 – 67.

27. Mans JJ, Baker HV, Oda D, Lamont RJ i inni. Distinctive characteristics of transcriptional profiles from two epithelial cell lines upon interaction with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 261 – 7.
28. Melgar-Rodriguez S, Diaz-Zuniga J, Alvarez C, Rojas L i inni. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular Oral Microbiol* 2016; 31: 162 – 74.
29. Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1991; 59: 2719 – 26.
30. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect. Immun* 1994; 62: 928 – 35.
31. Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* 1996; 64: 2988 – 97.
32. Mintz KP, Fives-Taylor PM. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 109 – 16.
33. Nędzi-Góra M, Kowalski J, Górska R. The Immune Response in Periodontal Tissues. *Arch Immunol Ther Exp* 2017; 65: 421 – 9.
34. Norskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 2135 – 46.
35. Perry MB, Maclean LM, Brisson JR, Wilson ME. Structures of the Antigenic O-Polysaccharides of Lipopolysaccharides Produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotypes a, c, d and e. *FEBS J* 1996; 242: 682 – 8.
36. Potts TV, Zambon JJ, Genco RJ. Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the genus *Haemophilus* as *Haemophilus actinomycetemcomitans*. *Int J Syst Bacteriol* 1985; 35: 337 – 41.
37. Rahamat-Langendoen JC, van Vonderen MG, Engstrom LJ, Manson WL i inni. Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 702 – 6.
38. Rose JE, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun* 2003; 71: 2384 – 93.
39. Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhala L i inni. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 277 – 9.
40. Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, Kipps B i inni. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet-activating factor. *Infect Immun* 2000; 68: 5416 – 9.
41. Shanmugam M, Gopal P, El Abbar F, Schreiner HC i inni. Role of exopolysaccharide in *aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced bone resorption in a rat model for periodontal disease. *PLoS ONE* 2015; 10: e0117487.

42. Shimada T, Sugano N, Nishihara R, Suzuki K i inni. Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 455 – 8.
43. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C i inni. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134 – 44.
44. Spitznagel J Jr, Kraig E, Kolodrubetz D. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1991; 59: 1394 – 401.
45. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF i inni. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 369 – 74.
46. Takasaki K, Fujise O, Miura M, Hamachi T i inni. *Porphyromonas gingivalis* displays a competitive advantage over *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in co-cultured biofilm. *J Periodontol Res* 2013; 48: 286 – 92.
47. Yue G, Kaplan JB, Furgang D, Mansfield KG i inni. A second *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin exhibits specificity for buccal epithelial cells in humans and Old World primates. *Infect Immun* 2007; 75: 4440 – 8.
48. Zambon JJ, Christersson LA, Slots JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 1983; 54: 707 – 11.

Otrzymano: 3 VII 2018 r.

Adres Autora: 00-246 Warszawa ul. Miodowa 18, Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia WUM

Diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce

Establishment of the diagnostic cut-off points for levels of serum antibodies to pertussis toxin in adults in Poland

Waldemar Rastawicki, Natalia Rokosz-Chudziak, Karolina Śmietańska, Anna Chróst, Urszula Roguska

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

Na podstawie badania próbek surowicy uzyskanych od 236 krwiodawców wyznaczono diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej u osób dorosłych w Polsce. Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG za diagnostycznie znamiennej poziom (cut-off) należałoby przyjąć wartość 120 IU/ml, natomiast przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgA wartość 16 IU/ml. Obecność przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej na diagnostycznie znamiennej poziomie wykazano w 18 (7,6%) próbkach, natomiast przeciwciał klasy IgA w 14 (5,9%) próbkach surowicy krwiodawców.

Słowa kluczowe: krztusiec, toksyna krztuścowa, diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał, cut-off, ELISA

ABSTRACT

Introduction: Standardization of ELISA tests for the diagnosis of infections caused by *B. pertussis* remains challenging despite efforts to improve it. It is recommended that serology testing should use purified pertussis toxin as the only coating antigen and that concentration of antibodies should be expressed in international units per mL (IU/ml) according to the First WHO International Standard for Pertussis Antiserum. However, available commercial ELISAs are often of different antigen composition and quality and sometimes do not calculate antibody levels in IU/ml. Furthermore, for single-sample serology, various cut-off values for IgG- and IgA-anti pertussis toxin in different EU reference laboratories have been proposed. The aim of this study was to establish of the diagnostic cut-off points for levels of serum IgG and IgA antibodies to pertussis toxin in adults in Poland and determine the seroprevalence of these antibodies among Polish blood donors.

Materials and Methods: The IgG and IgA antibodies in serum samples collected from 236 blood donors were measured by in-house ELISA with purified pertussis toxin as antigen (0,5 µg/ml). The cut-off value was settled by calculation the OD₄₅₀ results from all blood donors (arithmetic mean plus 2 standard deviations). Antibody levels were quantitated with respect to the First WHO International Standard for Pertussis Antiserum (06/140) and results were expressed in IU/mL.

Results: According to the obtained results, in the case of searching for IgG and IgA antibodies for pertussis toxin, a cut-off of 120 IU/ml and 16 IU/ml respectively, should be taken as diagnostic significant level in the adult population in Poland. A study showed the presence of IgG antibodies at a diagnostic level in 18 (7.6%) samples, and IgA antibodies to pertussis toxin in 14 (5.9%) serum samples obtained from blood donors.

Conclusions: The established in our investigation cut-off values for anti-PT IgG and IgA good correspond with values recommended by reference laboratories in other European countries.

Key words: pertussis, pertussis toxin, diagnostic significant level of antibodies, cut-off, ELISA

WSTĘP

Krztusiec jest ostrą, zakaźną chorobą dróg oddechowych, wywoływaną przez pałeczki *B. pertussis*. Pomimo, że jest to choroba głównie wieku dziecięcego, coraz częściej dotyka również osób dorosłych (1, 3, 13, 18, 19, 26).

Poszukiwanie odczynem ELISA swoistych przeciwciał dla toksyny krztuścowej, zwłaszcza u osób dorosłych, jest bardzo często wykorzystywaną metodą w diagnostyce krztuśca. Badania te są prowadzone zarówno testami ELISA opracowanymi we własnym zakresie (in-house) jak też zestawami komercyjnymi, które ze względu na zastosowany rodzaj antygeny, jego użytkowe stężenie jak również ustalony przez producenta poziom przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamienne (cut-off), różnią się między sobą czułością i swoistością (2, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 20, 21). Co więcej, w niektórych zestawach oznaczany poziom przeciwciał podawany jest jedynie jako indeks wartości w stosunku do surowicy kontrolnej cut-off dołączanej do testu, zamiast w jednostkach międzynarodowych (IU/ml), wyliczanych na podstawie badania wzorca WHO. Wszystko to powoduje, że trudno jest porównywać między sobą wyniki serologicznych badań w kierunku krztuśca prowadzonych w różnych laboratoriach oraz nie pozwala ustalić faktycznej częstości występowania krztuśca w poszczególnych krajach.

Celem prezentowanej pracy było ustalenie w międzynarodowych jednostkach (IU/ml) diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce a także określenie częstości występowania tych przeciwciał u badanej grupy krwiodawców.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Przedmiotem badań było 236 próbek surowicy uzyskanych od klinicznie zdrowych osób dorosłych (krwiodawców) zamieszkałych w Polsce. Nie dysponowano danymi dotyczącymi wieku badanych osób.

Odczyn ELISA. Badania przeprowadzono pośrednim testem immunoenzymatycznym ELISA opracowanym we własnym zakresie zgodnie z ogólnie przyjętą metodyką. Jako antygeny w odczynie ELISA użyto oczyszczonej toksyny krztuścowej (PT), otrzymanej od Statens Serum Institute w Kopenhadze. Użytkowe stężenie toksyny krztuścowej nanoszonej do dołków płytki metapleksowej wynosiło 0,5 µg/ml. W badaniach zastosowano koniugaty firmy Dako (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/IgG/IgM/HRP) dla ludzkich przeciwciał klasy IgG i IgA. Wartości absorbancji odczytywano przy długości fali światła 450 nm.

Wyznaczanie diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał w jednostkach międzynarodowych (IU/ml). W pierwszej kolejności wartość diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej wyliczono ze średniej arytmetycznej wartości OD_{450} oznaczonych w próbkach surowicy 236 krwiodawców powiększonej o 2 odchylenia standardowe. Następnie, w celu przeliczenia tak wyznaczonej wartości cut-off na jednostki międzynarodowe (IU/ml), posłużono się krzywą logarymiczną wyznaczoną w programie Excel na podstawie badania międzynarodowego wzorca (WHO International Standard Pertussis Antiserum, code 06/140; National Institute for Biological Standards and Control, Poppers Bar, United Kingdom) o stężeniu przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej równym 335 IU/ml oraz klasy IgA równym 65 IU/ml.

WYNIKI

W tabeli I przedstawiono diagnostycznie znamienne poziomy przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej (wartości cut-off) podane w jednostkach międzynarodowych, wyznaczone na podstawie badania próbek surowicy 236 krwiodawców. I tak, zgodnie z uzyskanymi wynikami, w populacji osób dorosłych w Polsce za wynik diagnostycznie znamieny, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej należałoby przyjąć wartość 120 IU/ml, natomiast przeciwciał klasy IgA wartość 16 IU/ml.

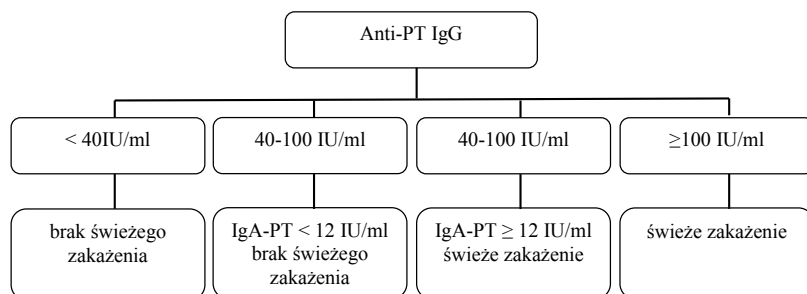
Tabela I. Diagnostycznie znamienne poziomy przeciwciał klasy IgG i IgA (cut-off) dla toksyny krztuścowej u osób dorosłych w Polsce.

	Klasa IgG	Klasa IgA
Średnia wartość OD_{450} (\bar{x})	0,634	0,348
Odchylenie standardowe (SD)	0,300	0,131
Wartość: $\bar{x} + 2SD$	1,235	0,611
Wyliczony, wobec standardu WHO 06/140, diagnostycznie znamieny poziom przeciwciał dla toksyny krztuścowej (cut-off)	120 IU/ml	16 IU/ml

Badanie 236 próbek surowicy krwiodawców wykazało obecność przeciwciał klasy IgG na poziomie 30-60 IU/ml w 57 (24,2%) próbkach, na poziomie 60-120 IU/ml w 29 (12,3%) próbkach, natomiast na diagnostycznie znamionym poziomie ≥ 120 IU/ml w 18 (7,6%) próbkach surowicy. Przeciwciała klasy IgA dla toksyny krztuścowej na poziomie 4-8 IU/ml wykryto w 48 (20,4%) próbkach, na poziomie 8-16 IU/ml w 26 (11,0%) próbkach, natomiast na poziomie ≥ 16 IU/ml w 14 (5,9%) próbkach surowicy krwiodawców (Tabela II).

Tabela II. Występowanie przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej w próbkach surowicy uzyskanych od 236 krwiodawców.

Poziom przeciwciał klasy IgG	Liczba (odsetek) próbek surowicy
<30 IU/ml	132 (55,9%)
30-60 IU/ml	57 (24,2%)
60-120 IU/ml	29 (12,3%)
≥ 120 IU/ml	18 (7,6%)
Poziom przeciwciał klasy IgA	Liczba (odsetek) próbek surowicy
<4 IU/ml	148 (62,7%)
4 - 8 IU/ml	48 (20,4%)
8-16 IU/ml	26 (11,0%)
≥ 16 IU/ml	14 (5,9%)



Rycina 1. Diagnostyczny algorytm w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG i IgA dla toksyny krztuścowej (23).

DYSKUSJA

Podczas interpretacji wyników badań serologicznych niezmiernie istotne jest precyzyjne określenie diagnostycznie znamionego poziomu przeciwciał (tzw. wartości cut-off) świadczącego o świeżym lub niedawno przeżytym zakażeniu. Określenie tego poziomu utrudnia fakt obecności przeciwciał u osób w danej populacji, związany zarówno z występowaniem nieswoistych reakcji krzyżowych, przeciwciał po przeżytym bezobjawowym zakażeniu czy też 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 (22).

Wiarygodne ustalenie tej wartości w serodiagnostyce krztuśca, ze względu na wysoki poziom przeciwciał dla antygenów *B. pertussis* w populacji osób szczepionych, jest zadaniem szczególnie trudnym. Dodatkowo, w prawidłowo przeprowadzonych badaniach serologicznych może zająć potrzeba ustalenia różnej wartości diagnostycznie znamiennej poziomu przeciwciał w zależności od badanej populacji osób. Z tego powodu, niektórzy producenci wyznaczają nawet różne poziomy cut-off dla osób z różnych grup wiekowych.

W praktyce laboratoryjnej, diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał określa się najczęściej na podstawie badania surowicy kontrolnej cut-off, dołączonej przez producenta do danego zestawu ELISA. Wielkość wartości cut-off oblicza się 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 zniżenia tej wartości zwiększamy czułość testu a obniżamy swoistość, natomiast przy jej zawyżeniu mamy sytuację odwrotną (22).

Powszechnie w serodiagnostyce krztuśca wykorzystuje się komercyjne zestawy ELISA, oferujące możliwość oznaczenia przeciwciał klasy IgG i IgA skierowanych najczęściej dla toksyny krztuścowej. Dołączone do zestawów surowice kontrolne pozwalają na określenie poziomu przeciwciał, który należy uznać za diagnostycznie znamiennej (surowica cut-off) oraz na kontrolę poprawności wykonania testu (surowica kontrolna dodatnia i ujemna). Ponieważ wartość odcięcia została ustalona przez producentów tych zestawów na podstawie poziomu przeciwciał w populacji osób zdrowych zamieszkałych w krajach Europy Zachodniej bądź też nawet Ameryki Północnej, zachodzi pytanie czy jest ona odpowiednia do badania poziomu krztuścowych przeciwciał u osób w Polsce. Może zaistnieć bowiem sytuacja, że ustalona w komercyjnych zestawach wartość surowicy cut-off nie będzie adekwatna do wartości cut-off wyliczonej na podstawie badania próbek uzyskanych od osób zdrowych zamieszkałych w naszym kraju. Dobitym tego przykładem są wyniki badań przeprowadzonych przez nas uprzednio, dotyczących wiarygodności wartości cut-off w dwóch wykorzystywanych w serodiagnostyce krztuśca w Polsce komercyjnych zestawach ELISA (21).

Mając na uwadze argumenty podane powyżej, w aktualnie prezentowanej pracy postanowiono ustalić diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał dla toksyny krztuścowej u dorosłych osób w Polsce w jednostkach międzynarodowych (IU/ml). Poznanie tej wartości może być bardzo przydatne w analizie porównawczej komercyjnych zestawów ELISA wykorzystywanych w serodiagnostyce krztuśca a także w badaniach epidemiologicznych. I tak, zgodnie z uzyskanymi wynikami, w populacji osób dorosłych w Polsce za wynik diagnostycznie znamiennej, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej, należałoby przyjąć wartość 120 IU/ml, natomiast przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgA wartość 16 IU/ml. Przy tak wyliczonym cut-off, badając stosunkowo niewielką grupę 236 krwiodawców zamieszkałych w Polsce, dodatni wynik w klasie IgG uzyskano w 7,6% a w klasie IgA w 5,9% próbek surowicy.

W dostępnym piśmiennictwie, w zależności od kraju i grupy badawczej, istnieją spore rozbieżności co do wartości cut-off przeciwciał klasy IgG, którą należy przyjąć w serodiagnostyce krztuśca. Wartości te wahają się od ≥ 200 IU/ml (Massachusetts, USA), poprzez

≥ 125 IU/ml (Holandia), 50 IU/ml (Australia) do nawet 40 IU/ml (Niemcy) (23). W seroepidemiologicznych badaniach prowadzonych w krajach Europy Zachodniej w 2005 roku przyjęto poziom cut-off przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej równy 125 IU/ml (17). Techniczny dokument ECDC z 2012 roku (6) zaleca stosowanie w serodiagnostyce krztuśca dwóch wartości cut-off przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej: 62 IU/ml i 125 IU/ml, do określenia wyniku ujemnego, wątpliwego oraz dodatniego u osób, które nie były szczepione w ostatnich 12 miesiącach. W Danii, za diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej, przyjęto w odczynie ELISA in-house wartość 75 IU/ml (5). Podobnie jak w naszym badaniu, wielkość tą wyznaczono na poziomie średniej wartości poziomu przeciwciał oznaczonych w próbkach surowicy 271 krwiodawców powiększonej o dwa odchylenia standardowe. Przy takim kryterium cut-off, w badaniach przeprowadzonych w tym kraju w latach 2006-2008, dodatni wynik badania serologicznego w kierunku krztuśca uzyskano u 3,0% badanych osób dorosłych (25).

Na rycinie 1 przedstawiono algorytm, zaproponowany przez *Riffelmann* i wsp. (23), według którego należałoby interpretować wyniki badań serologicznych w kierunku krztuśca. I tak, wykrycie w próbce surowicy przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej na poziomie poniżej 40 IU/ml świadczy o braku świeżego zakażenia pałeczkami *B. pertussis*. W przypadku oznaczenia przeciwciał klasy IgG na poziomie wątpliwym (40-100 IU/ml) do potwierdzenia zakażenia ważne jest wykazanie diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał klasy IgA (≥ 12 IU/ml), natomiast przy poziomie przeciwciał IgG ≥ 100 IU/ml, bez względu na poziom przeciwciał klasy IgA, mamy już do czynienia ze świeżym lub niedawno przebyłym zakażeniem pałeczkami krztuśca.

Zgodnie z tym algorytmem, w większości komercyjnych zestawów ELISA wykorzystywanych do serodiagnostyki krztuśca, producenci przyjmują za dodatni wynik badania, świadczący o świeżym lub niedawno przebyłym zakażeniu, wartość cut-off przeciwciał klasy IgG ≥ 100 IU/ml, natomiast za wynik ujemny wartość < 40 IU/ml.

Przyjęcie wspólnego, jednoznacznego kryterium pozwala w sposób bardziej miarodajny porównać wyniki badań prowadzonych w poszczególnych krajach. Przykładowo, przy wykorzystaniu zestawu firmy Virion-Serion diagnostycznie znamiennej poziom przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej (≥ 100 IU/ml) wykryto w 4,0% próbek surowicy uzyskanych od zdrowych osób w wieku 20-39 lat w Belgii (11). Z kolei w badaniach prowadzonych komercyjnym zestawem firmy Euroimmun wykryto przeciwciała klasy IgG dla toksyny krztuścowej na poziomie wątpliwym (62,5-125 IU/ml) w 2,7% próbek oraz na poziomie diagnostycznie znamienym (≥ 100 IU/ml) tylko w 0,6% próbek surowicy uzyskanych od osób dorosłych w Estonii (12). Odczynem ELISA Pertussaan PT-G Euro Diagnostica AB, wysoki poziom przeciwciał klasy IgG dla toksyny krztuścowej (≥ 110 IU/ml) wykryto u 3,3% pracowników medycznych w trzech szpitalach w Hiszpanii (24). Przy użyciu zestawu tej samej firmy wykryto świeże lub niedawno przebyte zakażenie pałeczkami *B. pertussis* u 1,2% osób dorosłych na Węgrzech oraz 0,4% osób dorosłych w Czechach (4, 27).

Podsumowując, wyniki naszych badań dotyczących określenia diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał dla toksyny krztuścowej u osób dorosłych w Polsce, bardzo dobrze korespondują z wynikami badań przeprowadzonych w innych krajach oraz oficjalnymi zaleceniami ECDC. Stosunkowo wysoki odsetek wyników dodatnich uzyska-

nych podczas badania klinicznie zdrowych krwiodawców może świadczyć o tym, że osoby dorosłe, często nie wykazujące objawów choroby, są istotnym rezerwuarem dla pałeczek krztuśca. Jednakże, na podstawie badania tak małej grupy krwiodawców trudno wyciągać daleko idące wnioski co do częstości występowania krztuśca u osób dorosłych w Polsce. Konieczne są dalsze badania, przeprowadzone na reprezentatywnej grupie osób.

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 probówkowej. Aktualnie, w badaniach wykonywanych odczynem 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 (22). Tak więc, 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 (10).

PIŚMIENNICTWO

1. *Bamberger E, Srugo I.* What is new in pertussis? *Eur J Pediatr* 2008; 167: 133-9.
2. *Baughman AL, Bisgard KM, Edwards KM* i inni. Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 1045-53.
3. *Branski D, Kerem E.* Clinical manifestations of *Bordetella pertussis* infection in immunized children and young adults. *Chest* 1999; 115:1254-8.
4. *Chlibek R, Smetana J, Sosovickova R* i inni. Seroepidemiology of whooping cough in the Czech Republic: estimates of incidence of infection in adults. *Public Health* 2017; 77-83.
5. *Dalby T, Harrboe ZB, Kroghfelt KA.* Seroprevalence of pertussis among Danish patients with cough of unknown etiology. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 2016-23.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. ECDC Technical Document, Stockholm, 2012
7. *Fedele G, Leone P, Bellino S* i inni. Diagnostic performance of commercial serological assays measuring *Bordetella pertussis* IgG antibodies. *Diag Microbiol Infect Dis* 2018; 90: 157-62.
8. *Friedman R.* Pertussis: The disease and new diagnostic methods. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 365-76.

9. Granström G, Wretling B, Salenstedt CR, Granström M. Evaluation of serologic assay for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1818-23.
10. 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.
11. Huygen K, Rodeghiero C, Govaerts D i inni. *Bordetella pertussis* seroprevalence in Belgian adults aged 20-39 years, 2012. *Epidemiol Infect* 2014; 142: 724-8.
12. Jögi P, Oona M, Toompere K, Lutsar I. Estimated and reported incidence of pertussis in Estonian adults: A seroepidemiological study. *Vaccine* 2015; 33: 4756-61.
13. Kapaskelis AM, Vouloumanou EK, Rafailidis PI i wsp. High prevalence of antibody titers against *Bordetella pertussis* in adult population with prolonged cough. *Resp Med* 2008; 102: 1586-91.
14. Kösters K, Riffelmann M, Dohrn B i inni. Comparison of five commercial enzyme – linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *Clin Diag Lab Immunol* 2000; 7: 422-6.
15. Melker HE, Versteegh FGA, Conyn-van Spaendonck i inni. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 800-6.
16. Mertens P, Stals F, Steyerberg E, Richardus J. Sensitivity and specificity of single IgA and IgG antibody concentration for early diagnosis of pertussis in adults: an evaluation for outbreak management in public health practice. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 53.
17. Pebody RG, Gay NJ, Giammanco A i inni. The seroepidemiology of *Bordetella pertussis* in Western Europe. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 159-71.
18. Palazzo R, Carollo M, Fedele G i inni. Evidence of increased circulation of *Bordetella pertussis* in the Italian adult population from seroprevalence data (2012-2013). *J Med Microbiol* 2016; 65: 649-57.
19. Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Częstość wykrywania przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla toksyny krztuścowej w rutynowo prowadzonej serodiagnostyce krztuśca u osób ze stanami zapalnymi układu oddechowego w Polsce. *Przeegl Epidemiol* 2009; 63: 513-8.
20. Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M i inni. Porównanie wyników serologicznych badań w kierunku krztuśca rutynowo prowadzonych w trzech różnych laboratoriach w Polsce. *Med Dośw Mikrobiol* 2010; 109-17.
21. 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.
22. Rastawicki W. Serologiczna diagnostyka bakteryjnych zakażeń człowieka – błędy popełniane w wyborze i wykonaniu badań laboratoryjnych oraz w interpretacji ich wyników. *Med Dośw Mikrobiol* 2017; 69: 289 – 99.
23. Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J i inni. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4459-63.

24. *Rodriguez de la Pinta ML, Castro Lareo MI, Ramon Torrell JM* i inni. Seroprevalence of pertussis amongst healthcare professionals in Spain. *Vaccine* 2016; 34: 1109-114.
25. *Rønn PF, Dalby T, Simonsen J, Jørgensen CS* i inni. Seroepidemiology of pertussis in a cross-sectional study of an adult general population in Denmark. *Epidemiol Infect* 2014; 142: 729-37.
26. *Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS*. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1691-7.
27. *Torzsa P, Devadiga R, Tafalla M*. Seroprevalence of *Bordetella pertussis* antibodies in adults in Hungary: results of an epidemiological cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 242-9.

Otrzymano: 24 IX 2018 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych NIZP-PZH

Charakterystyka obecności genetycznych determinantów warunkujących oporność pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 izolowanych w Polsce w 2009 r. na wybrane antybiotyki β -laktamowe

Presence of β -lactamase encoding genes in clinical isolates of *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8mm isolated in Poland in 2009

Katarzyna Zacharczuk

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa

Przeprowadzono analizę obecności genetycznych determinantów warunkujących oporność pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 izolowanych z materiału klinicznego w Polsce w 2009 r., na wybrane antybiotyki β -laktamowe (tikarcylina i ampicylina) z uwzględnieniem ustalenia wartości MIC szczepów opornych. Wszystkie badane izolaty *Y. enterocolitica* 1B/O8 wykazywały oporność na tikarcylinę, natomiast jedynie 9,5% drobnoustrojów z tej grupy było opornych na ampicylinę. W teście PCR stwierdzono również, iż badane izolaty charakteryzowały się obecnością genów *blaA* i *ampC* (*blaB*), warunkujących wytwarzanie enzymów rozkładających antybiotyki β -laktamowe. Obserwowane różnice w oporności na ampicylinę badanych izolatów przy ich przynależności do tego samego szczepu *sensu stricto* jak i wąskim przedziale czasowym ich izolacji mogą wskazywać na zmienną aktywność genetycznych determinant oporności na antybiotyki β -laktamowe pałeczek *Y. enterocolitica* 1B/O8.

Słowa kluczowe: *Yersinia enterocolitica*, bioserotyp 1B/O8, antybiotyki β -laktamowe, lekowrażliwość

ABSTRACT

Introduction: The intrinsic resistance to β -lactam antibiotics of *Y. enterocolitica* is mainly due to activity of two type β -lactamases, BlaA and BlaB, which are encoding by genes located on chromosome, *blaA* and *ampC*, respectively. High-pathogenicity bioserotype 1B/O8 of *Y. enterocolitica* has been isolated from clinical samples since 2004 year in Poland. The study shown that clinical isolates of *Y. enterocolitica* 1B/O8 collected from 2004 to 2009 in Poland constituted the same *sensu stricto* strain. The aim of present study was to determine the occurrence of genes encoding β -lactamases BlaA and BlaB with the MIC

value characterization for selected antibiotics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O isolated in Poland in 2009.

Methods: Ampicillin and ticarcillin minimum inhibitory concentrations (MICs) for 64 clinical *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8 isolates were determined by Etest and broth microdilution respectively. The *blaA* i *blaB* genes were detected by PCR.

Results: All investigated isolates were resistant to ticarcillin (MIC 16 – 128 mg/ml), whereas 9,5% to ampicillin (MIC 12 mg/l) according to EUCAST interpretive criteria. All isolates yielded the expected amplicons of *blaA* and *ampC* genes.

Conclusions: Observed differences in the resistance to ampicillin among analyzed isolates belonging to the epidemic *sensu stricto* strain can indicate the variable activity of genetic determinants of resistance to β -lactam antibiotics of *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, bioserotype 1B/O8, β -lactam antibiotics, antimicrobial susceptibility

WSTĘP

Większość zakażeń spowodowanych przez chorobotwórcze pałeczki z gatunku *Y. enterocolitica* ma charakter samoograniczający i wymaga głównie zastosowania leczenia objawowego, polegającego na przywróceniu równowagi wodno-elektrolitowej. Antybiotykoterapia jest zalecana w przypadkach zakażeń mających przebieg uogólniony (pozajelitowy), przewlekły, czy będących następstwem zakażenia, powikłań. Wskazane jest również rozpatrzenie włączenia antybiotyków do leczenia jersiniozy u osób z obniżoną odpornością lub chorobami towarzyszącymi (16, 33). Pałeczki *Y. enterocolitica* wykazują wrażliwość na szerokie spektrum antybiotyków oraz chemioterapeutyków stosowanych w terapii zakażeń ludzi i zwierząt (3, 14, 18). W leczeniu jersiniozy obecnie zaleca się stosowanie cefalosporyny III generacji, również w połączeniu z makrolidami, aminoglikozydami lub fluorochinolami (16).

Pałeczki *Y. enterocolitica* wykazują naturalną oporność na aminopenicyliny (w tym amoksycylinę), cefalosporyny I generacji i niekiedy także na sulfonamidy i antybiotyki z gr. cefamycyn (10, 17, 20, 25). Oporność na antybiotyki β -laktamowe jest związana z wytwarzaniem i aktywnością enzymów β -laktamaz: Bla-A (β -laktamazaza klasy A) i Bla-B B (β -laktamazaza klasy C, AmpC) (22). Geny kodujące oba enzymy znajdują się na chromosomie. β -laktamazaza BlaA jest enzymem o szerokim spektrum działania wobec penicylin, wytwarzanym konstytutywnie. Natomiast enzym BlaB należy do klasy cefalosporynaz, a jego obecność w komórce bakteryjnej jest indukowana przez odpowiedni induktor (20, 21, 22, 27). Według piśmiennictwa większość szczepów *Y. enterocolitica* należących do wszystkich wyróżnionych biotypów oraz grup serologicznych: O1, O2, O3 i O9, posiada zdolność do wytwarzania obu β -laktamaz. U szczepów serotypu O5,27 stwierdzono tylko aktywność enzymu BlaB. Ponadto szczepy należące do biotypu 1A mogą produkować enzym BlaA oraz „Bla B –like” o podobnym spektrum działania co BlaB, ale różniący się wartością pI (punktu izoelektrycznego) (27). W przypadku pałeczek należących do bioserotypu 1B/O8 Pham i wsp., stwierdzili w grupie badanych szczepów aktywność en-

zymu BlaB oraz β -laktamazymy podobnej do BlaA, „BlaA-like”, której aktywność wobec ampicyliny i karbapenicylin była znacząco niższa w porównaniu do tej jaką wykazywał enzym BlaA (22).

Zaobserwowano, iż pałeczki *Y. enterocolitica* w zależności od bioserotypu, typu fagowego czy subtypu wykazują zróżnicowany profil lekooporności. Wynika to przypuszczalnie z mutacji w genach kodujących te enzymy, które mogą prowadzić do braku wytwarzania lub zmian w ich aktywności wobec danych antybiotyków (27, 29, 30).

W Polsce wg danych literaturowych ogólny profil lekooporności pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu 4/O3 izolowanych od ludzi do 2009 r., pozostawał bez zmian. Badane szczepy wykazywały oporność na penicyliny i cefalosporyny I generacji oraz wrażliwość na cefalosporyny III generacji, gentamicynę i ciprofloksacynę (25, 31). Jednakże w przypadku szczepów izolowanych w latach 2004-2009, około 12% należących do bioserotypu 4/O3 było opornych lub średnio wrażliwych na działanie amoksycyliny z inhibitorem β -laktamaz, kwasem klawulanowym. Wśród badanych szczepów, pięć o bioserotypie 4/O3 oraz 2/O9, zaliczono do grupy MDR czyli szczepów wielolekoopornych. Po raz pierwszy w Polsce Szych i wsp. (31) określili także lekowrażliwość szczepów *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8, wyhodowanych od ludzi w latach 2004-2009. Wykazywały one oporność na ampicylinę oraz tikarcylinę.

Oporność na antybiotyki inne niż β -laktamowe (tetracyklina, chloramfenikol, kotrimoksazol, streptomycyna, nitrofurantoina, trimetoprim - sulfametoksazol) wśród pałeczek *Y. enterocolitica* jest również obserwowana, aczkolwiek odsetek takich szczepów jest niewielki (4, 9, 10, 28, 31).

Wysoki wzrost odsetka szczepów *Y. enterocolitica* O3 opornych na kwas nalidyksowy (grupa antybiotyków: chinolony) zaobserwowano w Hiszpanii, w latach 1995-2000 sięgał on 5%, zaś w 2002 r. wzrósł do 23% (4, 5). Oporność pałeczek *Yersinia* na ten antybiotyk zwiększa prawdopodobieństwo ewentualnego niepowodzenia terapeutycznego przy antybiotykoterapii fluorochinolonami, w tym ciprofloksacyną.

Pałeczki *Y. enterocolitica* należące do bioserotypu 1B/O8 uznawane są za wysoce chorobotwórcze drobnoustroje (high-pathogenicity), ze względu na posiadane przez nie obok klasycznych czynników wirulencji charakterystycznych dla chorobotwórczych pałeczek *Y. enterocolitica* dodatkowe determinanty, tj. yersiniabaktyna Ybt, system sekrecji białek Ysa, fosfolipaza A (YplaA), Yst1 (chromosomalny system transportu białek typu II, (T2SS)). Drobnoustroje *Y. enterocolitica* z bioserotypu 1B/O8 są izolowane od ludzi w Polsce od 2004 r., podczas gdy na świecie przypadki jersiniozy wywołane przez tą grupę bakterii są rejestrowane bardzo rzadko. Przeprowadzone badania na grupie izolatów *Y. enterocolitica* 1B/O8 wyosobnionych w Polsce z materiału klinicznego w roku 2009 wykazały wysoką stabilność determinant chorobotwórczości oraz wysoki stopień genetycznego podobieństwa wśród tej grupy drobnoustrojów. Wyniki te potwierdziły wcześniejszą tezę, iż populacja pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 występująca na terenie Polski reprezentowana jest przez ten sam szczep *sensu stricto* (13, 35).

Celem prowadzonych badań było scharakteryzowanie obecności genetycznych determinantów warunkujących oporność badanych pałeczek *Y. enterocolitica* 1B/O8 na wybrane antybiotyki β -laktamowe z uwzględnieniem ustalenia wartości MIC szczepów opornych w odniesieniu do możliwości zastosowania profilu lekooporności jako elementu typowania tej grupy drobnoustrojów. Prezentowane wyniki stanowią część badań przepro-

wadzonych w ramach rozprawy doktorskiej pt.: ”Molekularna charakterystyka pałeczek *Yersinia enterocolitica* 1B/O8 wyizolowanych od ludzi w Polsce w 2009 roku” (35).

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakteryjne. Materiał do badań stanowiły 64 *Y. enterocolitica* należące do bioserotypu 1B/O8 wyosobnione z materiału klinicznego od ludzi w 2009 roku w Polsce. Szczepy pochodziły z kolekcji Zakładu Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych NIZP-PZH. Izolaty zostały wyosobnione w większości przypadków z próbek kału (n=42), wymazu z odbytu (n=5), krwi (n=3) oraz z wymazu z jamy brzusznej (n=2). Pojedyncze izolaty wyhodowano z materiału pobranego w formie wymazu: z gardła, rany poopercyjnej; z ropnia: pachwiny, przestrzeni zaotrzewnej; ropy (po operacji wyrostka robaczkowego) oraz z czyraka na czole. Dla 12 izolatów nie uzyskano informacji o rodzaju materiału, z którego zostały one wyosobnione. W badaniach posłużono się także szczepami referencyjnymi *Y. enterocolitica* 1B/O8 (n=9) z kolekcji Referencyjnego Ośrodka WHO ds. *Yersinia* (Instytut Pasteura, Francja).

Reidentyfikacja, biotypowanie i określenie grupy antygenowej. Reidentyfikację badanych szczepów przeprowadzono zgodnie z zaleceniami NIZP-PZH (32), biotypowanie przeprowadzono metodą wg *Wautersa* i wsp. (34). Określenie grupy antygenowej wykonywano przy użyciu testu lateksowego przygotowanego we własnym zakresie (11, 15).

Oznaczanie lekowrażliwości szczepów. Oznaczenie minimalnego stężenia antybiotyków hamujących wzrost drobnoustrojów (MIC) wykonano dla dwóch antybiotyków β-laktamowych: tikarcyliny oraz ampicyliny, zgodnie z zaleceniami EUCAST. W przypadku tikarcyliny (Sigma) zastosowano referencyjną metodą seryjnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu stałym. Dla oznaczenia wartości MIC dla ampicyliny użyto pasków Etest (Biomérieux) z gradientem stężeń antybiotyku. Interpretację wyników przeprowadzono zgodnie z zaleceniami EUCAST wg których wartości graniczne MIC (mg/L) określane dla drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae* dla tikarcyliny wynosiły: S ≤ 8 mg/l oraz R > 16 mg/l, zaś dla ampicyliny S ≤ 8 mg/l oraz R > 8 mg/l. Jako kontrolę stosowano szczep kontrolny *E. coli* ATCC2592.

Izolacja genomowego DNA. Izolację genomowego DNA badanych izolatów wykonano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (12).

Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR. Obecność fragmentów genów kodujących analizowane w pracy β-laktamazы pałeczek *Y. enterocolitica* określano w reakcji PCR typu duplex z użyciem genomowego DNA badanych izolatów przy użyciu starterów (Tabela 1.) Reakcję PCR przeprowadzono w końcowej objętości 25 μl. Mieszanina reakcyjna zawierała: jałową wodę dejonizowaną; 2,5 μl 10X buforu (Stratagene), 1 μl 25 mM roztworu MgCl₂ (Fermentas), 0,5 μl 10 mM mieszaniny dNTP (Sigma-Aldrich); 0,75 μl 10mM każdego ze starterów; 0,75 U μl polimerazy DNA (Paq5000 Stratagene) i 2 μl matrycy DNA. Reakcję amplifikacji prowadzono w termocyklerze Mastercycler AG 22331 (Eppendorf) w następujących warunkach: 94°C przez 5 min., następnie 35 cykli: 94°C przez 45 s, 58°C przez 45 s i 72°C przez 45s, ostatni etap 72 °C, 5 min.. Produkty amplifikacji rozdzielano w 2% żelu agarozowym (MP Biomedicals) w buforze 1xTBE.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wszystkie badane izolaty *Y. enterocolitica* 1B/O8 (n=64) wyosobnione od ludzi na terenie Polski w 2009 r. wykazywały oporność na tetracyklinę, gdzie wartość graniczna dla szczepów opornych wynosi >16 mg/l. Oznaczona wartość MIC tetracykliny dla 19%; 75% i 6% izolatów wynosiła odpowiednio 32, 64 i 128 mg/l. Odsetek izolatów *Y. enterocolitica* 1B/O8 opornych na ampicylinę wynosił 9,5% (MIC 12 mg/l). W przypadku szczepów *Y. enterocolitica* 1B/O8 (n=10) pochodzących z kolekcji zagranicznej Instytutu Pasteura wszystkie szczepy były odporne na tetracyklinę, oznaczona wartość MIC dla tego chemioterapeutyku wynosiła od 32 do 64 mg/l. Natomiast obserwowane u badanych szczepów wartości MIC dla ampicyliny były we wszystkich przypadkach niższe niż wartość graniczna (8 mg/l), powyżej której szczep uznawany jest za odporny. Pozytywny wynik testu PCR dla obu genów *blaA* i *ampC* stwierdzono u wszystkich badanych izolatów *Y. enterocolitica* 1B/O8.

Przeprowadzona przez Szych i wsp., (31), ocena lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną pałeczek *Y. enterocolitica* 1B/O8, izolowanych od ludzi w Polsce w latach 2004-2009 wykazała, iż drobnoustroje te były wrażliwe na antybiotyki z takich grup jak: aminoglikozydy, sulfonamidy, cefalosporyny III generacji, fluorochinolony czy tetracykliny. Natomiast w przypadku ampicyliny i tetracykliny, wśród badanych szczepów wyróżniono szczepy odporne i średnio wrażliwe na powyższe substancje (31).

Ze względu na doniesienia innych autorów, wskazujące na ograniczoną przydatność metody dyfuzyjno - krążkowej w ocenie lekowrażliwości pałeczek *Y. enterocolitica*, w pracy zastosowano metodę podwójnych rozcieńczeń w celu dokładnego określenia stężenia danego antybiotyku, przy którym zachodzi zahamowanie wzrostu badanych drobnoustrojów. Uzyskane wyniki wykazały, iż wszystkie badane izolaty *Y. enterocolitica* 1B/O8 wykazywały oporność na tetracyklinę w zakresie 32 - 128 mg/l. Największy odsetek badanych izolatów (75%), wyosobnionych na terenie Polski w 2009 r., posiadał wartość MIC 64 mg/l. Natomiast jedynie 9,5% polskich izolatów było opornych na ampicylinę (MIC 12 mg/l), podczas gdy szczepy referencyjne były wrażliwe. W badaniach zaś przeprowadzonych przez Szych i wsp., (31), w przypadku tetracykliny obserwowano wysoki odsetek (73,4%) średnio wrażliwych szczepów *Y. enterocolitica* 1B/O8. Należy jednak zaznaczyć, że uzyskane przez powyższych autorów wyniki wielkości stref zahamowania wzrostu były interpretowane według obowiązujących w tym czasie wytycznych CLSI (6). W Polsce od 2011 r., interpretacje wyników testu lekowrażliwości prowadzi się wg wytycznych EUCAST (7, 8), w których dokonano zmian wartości granicznych m.in.: dla ampicyliny i tetracykliny. Uznane więc jako średnio wrażliwe izolaty bioserotypu 1B/O8 wobec tetracykliny aktualnie byłyby sklasyfikowane jako odporne, co dodatkowo potwierdzałoby uzyskane w niniejszej pracy wyniki oznaczeń MIC.

Oznaczając lekowrażliwość drobnoustrojów należy mieć na uwadze możliwość wystąpienia błędnych wyników w zależności od zastosowanej metody. Meyer i wsp., (19) w swoich badaniach zauważyli, iż metoda dyfuzyjno-krążkowa jest obciążona większym prawdopodobieństwem otrzymania wyników fałszywych niż metoda kolejnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu (ang. MIC). Dużą ilość błędnie uznanych jako wrażliwe szczepów *Y. enterocolitica* otrzymano w przypadku ampicyliny (19).

Otrzymane wyniki oznaczeń MIC wskazują na znacznie większą wrażliwość pałeczek *Y. enterocolitica* należących do bioserotypu 1B/O8 niż do innych bioserotypów, dla których, wg piśmiennictwa odsetek szczepów opornych na ten antybiotyk mieścił się w zakresie od 77 % do 100% (1, 30). Zaobserwowana sytuacja może być prawdopodobnie wynikiem posiadania przez te drobnoustroje β -laktamazy typu „BlaA-like”. W badaniach przeprowadzonych przez Pham i wsp., (22), stwierdzono, że enzym typu „BlaA-like”, uznany jako specyficzny dla szczepów biotypu 1B, charakteryzuje się znacznie mniejszą efektywnością hydrolizy m.in. ampicyliny i karbapenicyliny niż enzym BlaA, czego wynikiem była obserwowana graniczna wrażliwość szczepów na powyższe substancje przeciwbakteryjne (2, 22). Oba enzymy mają podobne spektrum działania, ale różnią się wartością pI (punktu izoelektrycznego) i ta właściwość może być przyczyną ich różnej aktywności. Obecność β -laktamazy typu „BlaA-like” również mogłaby tłumaczyć niższe wartości MIC oznaczone dla tikarcyliny w przypadku pałeczek *Y. enterocolitica* 1B niż dla pałeczek należących do innych bioserotypów. Wspomniani wyżej autorzy dla 5 badanych izolatów *Y. enterocolitica* 1B określili wartość MIC na 32 mg/ml, podczas gdy dla pałeczek bioserotypu 2/O9; 2/O5,27, 4/O3; 3/O3, biotypu 1A i 5 zakres wartości MIC wynosił od 128 do 512 (22).

Mechanizm oporności na antybiotyki beta-laktamowe pałeczek *Y. enterocolitica* jest związany z wytwarzaniem β -laktamaz: BlaA i BlaB, oraz podtypów „BlaA-like” i „BlaB-like” (21). W pracy, w teście PCR stwierdzono obecność genów *blaA*, *ampC*, których występowanie wskazuje na posiadany przez te drobnoustroje potencjał do wytwarzania β -laktamaz. Jednakże obecność samych genów, nie świadczy o możliwości wytwarzania aktywnego enzymu. Jak wykazali de la Prieta i wsp., (23), mimo, iż u badanych szczepów należących do serotypu O5 i O5,27 wykryto geny *blaA* i *ampC*, tylko część szczepów wytwarzała jeden enzym, cefalosporynazę AmpC. Czynniki wpływającymi na brak aktywności enzymów hydrolizujących β -laktamowe antybiotyki są rearanżacje genetyczne, np. delecja 51 pz w genie *blaA*, zidentyfikowana w szczepie *Y. enterocolitica* 4/O3 IP97, prowadziła do całkowitej inaktywacji genu. Z kolei skutkiem mutacji w szczepie *Y. enterocolitica* 4/O3 Y56 była substytucja treoniny na alaninę, która powodowała zmniejszenie stopnia hydrolizy antybiotyku cefalotyny (24).

Profil lekowrażliwości pałeczek *Y. enterocolitica* na antybiotyki β -laktamowe jest zróżnicowany pomiędzy różnymi bioserotypami. Różnice w aktywności β -laktamaz BlaA oraz BlaB zostały również zaobserwowane w obrębie danego biotypu i były specyficzne dla grupy izolatów reprezentujących ten sam subtyp, typ fagowy czy miejsce (geograficzne) izolacji (21, 22). Szczepy *Y. enterocolitica* 4/O3 izolowane w różnych częściach świata, reprezentujące typ fagowy IXa wytwarzały obie laktamazy BlaA i BlaB podczas gdy szczepy *Y. enterocolitica* 4/O3 o typie fagowym IXb, izolowane w Australii i Nowej Zelandii tylko enzym BlaB (21, 22).

Obserwowane różnice w oporności na ampicylinę badanych izolatów *Y. enterocolitica* 1B/O8 przy ich przynależności do tego samego szczepu *sensu stricto* jak i wąskim przedziale czasowym ich izolacji (jeden rok) mogą wskazywać na zmienną aktywność genetycznych determinant oporności na antybiotyki β -laktamowe pałeczek *Y. enterocolitica* 1B/O8. Wyniki te mogą również świadczyć, iż profil lekooporności jako element typowania pałeczek tego bioserotypu może mieć ograniczoną przydatność.

Podziękowanie. Autor pracy składa podziękowania Dr. Elisabeth Carniel za udostępnienie szczepów *Y. enterocolitica* 1B/O8 pochodzących z kolekcji Ośrodka Referencyjnego WHO ds. *Yersinia*, Instytut Pasteura, Francja.

PIŚMIENNICTWO

1. Baumgartner A, Küffer M, Suter D i inni. Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 2007; 115: 110-4.
2. Bissett ML. *Yersinia enterocolitica* isolates from humans in California, 1968–1975. *J Clin Microbiol* 1976; 4: 137–44.
3. Bucher M, Meyer C, Grötzbach B i inni. Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000–2006. *Foodborne Pathog* 2008; 5: 273-80.
4. Capilla S, Goñi P, Rubio MC, Castillo i inni. Epidemiological study of resistance to nalidixic acid and other antibiotics in clinical *Yersinia enterocolitica* O:3 isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4876-8.
5. Capilla S, Ruiz J, Goñi P i inni. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistance in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 1068-71.
6. The Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Testing, 18th International Supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
7. EUCAST, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości. Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu. Wersja 2.0, 2012. [Internet]. 2012.
8. EUCAST, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu, wersja 1.3, 3, 2011. [Internet]. 2011.
9. Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A i inni. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1539-48.
10. Frazão MR, Andrade LN, Darini ALC, Falcão JP. Antimicrobial resistance and plasmid replicons in *Yersinia enterocolitica* strains isolated in Brazil in 30 years. *Braz J Infect Dis*. 2017; 4:477-80.
11. Gierczyński R. Ocena przydatności wybranych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów pałeczek *Yersinia enterocolitica* izolowanych z materiału klinicznego od ludzi. Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Państwowy Zakład Higieny w Warszawie. 1999.
12. Gierczyński R, Szych J, Cieślík A i inni. The occurrence of the first two CTX-M-3 and TEM-1 producing isolates of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg in Poland. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 21: 497-9.
13. Gierczyński R, Szych J, Rastawicki W i inni. Molecular characterization of human clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O8 in Poland: emergence and dissemination of three highly related clones. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1225-8.

14. Gumaste P, Boppana VS, Garcha AS, Blair D. Thigh Abscess Caused by *Yersinia enterocolitica* in an immunocompetent host. Case Rep Med 2012; 259475.
15. Jagielski M, Kochman M, Szych J i inni. Ocena przydatności odczynu lateksowego do wykrywania i identyfikacji O antygenów pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*. Med Dośw Mikrobiol 1996; 48: 31-7.
16. Jagielski M, Rastawicki W, Kałużewski S, Gierczyński R. Jersinioza – niedoceniana choroba zakaźna. Przegl Epidemiol 2002; 56: 57-64.
17. Janda JM i Abbot SL. The genus *Yersinia*, W: The Enterobacteria, Wydawnictwo: Lippincott-Raven, Philadelphia, New York 1998, 202-44.
18. Kay BA, Wachsmuth K, Gemski P i inni. Virulence and phenotypic characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from humans in the United States. J Clin Microbiol 1983; 17: 128-38.
19. Meyer C, Stolle A, Fredriksson-Ahomaa MC. Comparison of broth microdilution and disk diffusion test for antimicrobial resistance testing in *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains. Microb Drug Resist 2011; 17: 479-784.
20. Pham JN, Bell SM, Lanzarone JY. Biotype and antibiotic sensitivity of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 13-8.
21. Pham JN, Bell SM, Hardy MJ i inni. Susceptibility to beta-lactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world. J Med Microbiol 1995; 43: 9-13.
22. Pham JN, Bell SM, Martin L, Carniel E. The beta-lactamases and beta-lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 951-7.
23. de la Prieta MC, Seoame A, Díaz J i inni. Beta-lactamase genes and beta-lactamic susceptibility in *Yersinia enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol 1995; 13: 184-7.
24. de la Prieta MC, Francia MV, Seoane A, Lobo JM. Characterization of defective beta-lactamase genes in *Yersinia enterocolitica*. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 661-4.
25. Rastawicki W, Gierczyński R, Jagielski M i inni. Susceptibility of Polish clinical strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 to antibiotics. Int J Antimicrob Agents 2000; 13: 297-300.
26. Seoane A, Francia MV, García Lobo JM. Nucleotide sequence of the *ampC-ampR* region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36:1049-52.
27. Sharma S, Ramnani P, Viridi JS. Detection and assay of beta-lactamases in clinical and non-clinical strains of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 401-405.
28. Sihvonen LM, Toivonen S, Haukka K i inni. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimination of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. BMC Microbiol 2011; 11: 42. doi: 10.1186/1471-2180-11-42.
29. Stock I, Heisig P, Wiedemann B. Expression of β -lactamases in *Yersinia enterocolitica* strains of biovars 2, 4 and 5. J Med Microbiol 1999; 48: 1023-27.
30. Stock I, Heisig P, Wiedemann B. β -lactamase expression in *Yersinia enterocolitica* biovars 1A, 1B, and 3. J Med Microbiol 2000; 49: 403-8.

31. Szych J, Jakubczak A, Wardak S, Madajczak G. Ocena wrażliwości na wybrane antybiotyki pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* izolowanych z próbek materiału klinicznego w Polsce w latach 2004-2009. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 311-9.
32. Szych J. Zakażenia i zatrucia pokarmowe, wywołane przez bakterie rosnące w warunkach tlenowych. Diagnostyka laboratoryjna W: Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń pokarmowych oraz zatruc pokarmowych. Red. M. Jagielski, Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2010.
33. Szych J. Jersinioza –nowe zagrożenie mało znaną chorobą. *Nowa Klinika* 2011; 18: 4045-50.
34. Wauters G, Kandolo K, Janssens M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol*. 1987; 9: 14-21.
35. Zachareczuk K. Molekularna charakterystyka pałeczek *Yersinia enterocolitica* 1B/O8 wyizolowanych od ludzi w Polsce w 2009 roku. Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny w Warszawie. 2013.

Otrzymano: 15 X 2018 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny

Ocena stężenia kalprotektyny kałowej w próbkach pacjentów
z zakażeniem *Clostridium difficile*

Assessment of fecal calprotectin concentration in samples from patients
with *Clostridium difficile* infection.

Dorota Wultańska¹, Piotr Obuch-Woszczatyński¹, Michał Piotrowski¹, Hanna Pituch¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Celem pracy była ocena stężenia kalprotektyny w anonimizowanych, resztkowych pięćdziesięciu ośmiu próbkach kału, w których wykryto markery *Clostridium difficile* oraz ustalenie związku między stężeniem kalprotektyny a typem genetycznym (PCR-rybotypem (RT)) *C. difficile*. Z próbek wyhodowano 47 toksynotwórczych szczepów *C. difficile*, które zakwalifikowano, stosując metodę PCR-rybotypowanie, do następujących pięciu PCR-rybotypów (RT): RT027 (n=39), RT020 (n=4), RT176 (n=4), RT001 (n=1) i RT017 (n=1). Stężenie kalprotektyny w resztkowych próbkach kału było w zakresie od 199,7-1137,1 µg/g kału (wartości >150), co wskazywało na toczący się proces zapalny. Stwierdzono wysokie stężenie kalprotektyny w próbkach kału, natomiast nie wykazano statystycznie istotnych związków między wysokim stężeniem kalprotektyny a PCR-rybotypem *C. difficile* (p >0,05).

Słowa kluczowe: kalprotektyna, zakażenie *Clostridium difficile*, PCR-rybotyp

ABSTRACT

Introduction: *Clostridium difficile* infection (CDI) can cause of nosocomial diarrhoea and intestinal inflammation. Fecal calprotectin (fc) is a sensitive marker of intestinal inflammation, found to be associated with enteric bacterial infections as *C. difficile* infection (CDI).

Materials and Methods: We evaluated faecal calprotectin (fc) levels using a Ridascreen® Calprotectin test (R-Biopharm AG) in faecal samples of CDI positive patients diagnosed by *C. Diff* Quik Chek Complete (TechLab; Blacksburg, VA, USA and Alere; Waltham, MA, USA) test. Statistical analysis was performed for correlation of fc levels with infection with different *C. difficile* PCR-ribotypes (RTs). The study involved two groups of faecal

samples: 58 samples with glutamate dehydrogenase (GDH) plus TOX A/B positive and second group were 17 samples from healthy adults without diarrhoea and GDH/TOX A/B negative. All samples (n=75) were plated on CLO selective agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to grow a *C. difficile* strain. RTs was defined using specific primers.

Results: From 75 stool samples, 47 strains of *C. difficile* were cultured only from diarrheal patients. In 58 diarrhoeic stool samples, the range of calprotectin concentrations were 199.7-1137.15 $\mu\text{g/g}$ ($>150\mu\text{g/g}$, elevated concentration), which indicates on inflammatory process. *C. difficile* strains belonged to the following RTs: RT 027 (n=39), RT 020 (n=4), RT 176 (n=2), RT 001 (n=1) and RT 017 (n=1). In the 17 samples from the healthy adults, the range of calprotectin concentrations was 12.1-25.3 $\mu\text{g/g}$ stool (FC normal concentration $<50 \mu\text{g/g}$) and exclude intestinal inflammation. From none of these samples, the *C. difficile* strain was not cultured.

Conclusions: The study found a differentiated level of calprotectin in the gastrointestinal tract in patients with CDI. There were no statistically significant differences in the concentration of calprotectin between patients infected with RT027 and different PCR ribotypes than RT027 ($p > 0,05$). However, it should be emphasized that these tests carried out on a small number of samples. Examination of relationship between level of calprotectin and genetic type of *C. difficile* causing CDI requires further investigation.

Key words: calprotectin, *Clostridium difficile* infection (CDI), PCR- ribotype

WSTĘP

Clostridium difficile Gram-dodatnia beztlenowa laseczka, stanowi współcześnie najczęstszy czynnik etiologiczny biegunek szpitalnych. Zakażenie *C. difficile* (CDI) może przyjąć postać łagodnej, średniej lub ciężkiej biegunki, ale może rozwinąć się w rzekomoblioniaste zapalenie okrężnicy, a w najgorszym przypadku *megacolon toxicum* (3). Chorobotwórczość *C. difficile* związana jest z działaniem dwóch toksyn: toksyny A (enterotoksyny) i toksyny B (cytotoksyny) (4). Szczepy tzw. hiperwirulentne należące do PCR-rybotypu (RT) 027 posiadają geny trzeciej toksyny, tj. toksyny binarnej (CDT) (10). Szczepy RT027 spowodowały wiele ognisk epidemicznych w Ameryce Północnej i wielu krajach europejskich, w tym również w Polsce (10, 14). Do głównych czynników ryzyka rozwoju zakażenia *C. difficile* należy antybiotykoterapia, długa hospitalizacja oraz starszy wiek pacjenta (≥ 65 lat). Inne czynniki to między innymi stosowanie leków immunosupresyjnych i przeciwnowotworowych, inhibitorów pompy protonowej, zabiegi chirurgiczne w obrębie jamy brzusznej, przewlekłe schorzenia przewodu pokarmowego oraz terapia nowymi fluorochinolonami (6). Fluorochinolony (FQ) mogą być przyczyną selekcji wysoko opornych na FQ szczepów *C. difficile*, które wywołują biegunki epidemiczne w wielu krajach (9). Cechą charakterystyczną w przypadku zakażenia *C. difficile* (CDI) jest uszkodzenie komórek nabłonka okrężnicy i wytworzenie ostrej reakcji zapalnej. Jednym z biomarkerów stanu zapalnego jelit jest kalprotektyna (7, 11). Kalprotektyna jest białkiem o wielkości około 36 kDa, występującym w postaci dimeru. Badania in vitro wykazały, że kalprotektyna ma

działanie bakteriostatyczne i powoduje sekwestrację jonów magnezu i cynku (8). Celem pracy była ocena stężenia kałowej kalprotektyny u pacjentów z zakażeniem *C. difficile* oraz ustalenie czy istnieje związek między wysokim stężeniem FC a typem genetycznym (PCR-rybotypem (RT) *C. difficile*).

MATERIAŁ I METODY

Material. Materiałem do badań było pięćdziesiąt osiem anonimizowanych, losowo wybranych reszkowych próbek kału pochodzących od pacjentów z zakażeniem *C. difficile* (lata 2014-2016). Pozostałości próbek były przechowywane w stanie zamrożenia aż do czasu wykonania testu w kierunku kalprotektyny. Próbkę została uznana wcześniej jako dodatnie na podstawie wykrycia dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) i toksyn A/B wytwarzanych przez *C. difficile* z zastosowaniem testu C. Diff Quik Chek Complete (TechLab; Blacksburg, VA, USA and Alere; Waltham, MA, USA). Grupę odniesienia w przypadku oceny stężenia kalprotektyny stanowiło 17 próbek kału pochodzących od zdrowych osób dorosłych, które zadeklarowały udział w badaniu.

Izolacja szczepów *C. difficile* z próbek kału. Reszkowe próbki kału były systematycznie posiewane na podłoże selektywne CLO, zawierające Columbia agar z krwią baranią (5%) oraz cykloserynę, cefoksytynę i amfoterycynę B (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) w celu wyhodowania szczepu. Posiewy inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. Identyfikację *C. difficile* prowadzono na podstawie charakterystycznej morfologii kolonii, zielono-żółtej fluorescencji w świetle lampy Wood'a (długość fali 366 nm), swoistego zapachu p-krezolu i wyniku uzyskanego w barwieniu preparatów metodą Grama. Wyhodowane szczepy *C. difficile* poddano dalszym badaniom określając ich toksynotwórczość, stosując metody opisane wcześniej (10).

Określenie PCR-rybotypu szczepów *C. difficile*. PCR-rybotyp (RT) szczepu *C. difficile* określono w Pracowni Beztlenowców, w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, stosując metodę PCR-rybotypowanie. Umożliwia ona wykrywanie różnic w regionie DNA o wysokiej zmienności, położonym między genami kodującymi podjednostki 16S rRNA i 23S rRNA (16S-23S rRNA-intergenic region spacer). Do PCR-rybotypowania użyto pary starterów 16S (sekwencja 5'-GTG CGG CTG GAT CAC CTC CT-3') i 23S (sekwencja 5'-CCCTGCACCCT-TAATAACTTGACC-3') (2).

Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 20 µl próbki DNA badanego szczepu. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 µl. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze BIO-RAD PTC-100™. Reakcję PCR-rybotypowania przeprowadzano zgodnie z następującym profilem: wstępna denaturacja 6 min. w 94°C; 35 cykli złożonych z denaturacji 1 min w 94°C, przyłączania starterów 1 min w 57°C i wydłużania nici 1 min. w 72°C; końcowe wydłużanie nici 7 min. w 72°C. Produkt amplifikacji wykrywano metodą elektroforezy w 3% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w środowisku buforu TBE przy 100 V przez 4 godz. Żele fotografowano przy pomocy zestawu do dokumentacji Kodak Digital Science EDAS 120 i porównywano uzyskane wzory prążków ze szczepami wzorcowymi *C. difficile* kolekcji Cardiff-ECDC przechowywanej w banku szczepów.

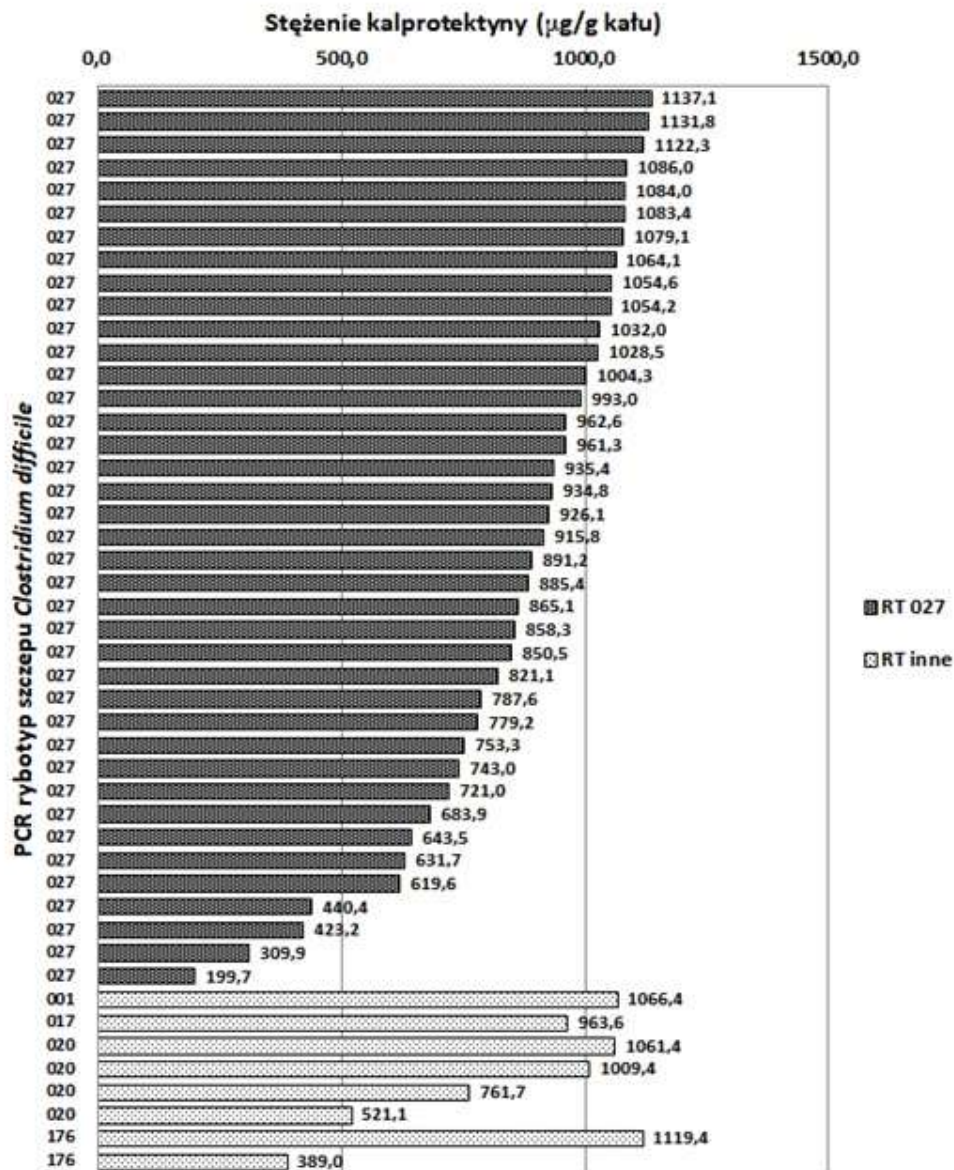
Oznaczenie stężenia kalprotektyny w próbkach kału. Resztkowe próbki kału przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -20°C aż do czasu wykonania badania w kierunku kalprotektyny. Rozmrożone próbki badano z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego Ridascreen® Calprotectin firmy R-Biopharm AG. Test wykonano zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie: do 100 mg próbki kału dodawano 5 ml buforu ekstrakcyjnego i poddawano homogenizacji przez około 30 sekund (w zależności od konsystencji), a następnie wirowano przez 10 minut, przy prędkości 3000 g. Otrzymany nadsącz próbek kału rozcieńczono 50 krotnie i po 100 μl przenoszono do studzienek reakcyjnych. Do kolejnych studzienek dodawano 100 μl kontroli ujemnej, po 100 μl 5 standardów, 100 μl kontroli dodatniej i 100 μl kontroli słabo dodatniej. Przykrytą płytkę inkubowano 60 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 5-krotnie buforem płuczącym, a następnie dodawano koniugat i ponownie przez 60 min. inkubowano w temperaturze pokojowej. Po Zakończeniu inkubacji każdą studzienkę reakcyjną przepłukiwano 5-krotnie buforem płuczającym, dodawano substrat i przykrytą płytkę inkubowano w ciemni w temp. pokojowej przez 15 minut. Po wyznaczonym czasie reakcja była zatrzymywana przez dodanie odczynnika STOP. Analizę fotometryczną wykonywano przy długości fali 450 nm i fali odniesienia o długości 620 nm w spektrofotometrze firmy BIO-RAD PR 3100. Stężenia kalprotektyny odczytywano z krzywej standardowej, wykreślonej zgodnie z zaleceniami producenta, dla każdej serii próbek.

Analiza statystyczna. Uzyskane wyniki poddano analizie z wykorzystaniem arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel oraz programu Statistica 13 (StatSoft Polska). Zależność stężenia kalprotektyny od PCR-rybotypu (RT) *C. difficile* ustalono na podstawie testu t-studenta. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Z badanych, anonimizowanych, pięćdziesięciu ośmiu resztkowych próbek kału, w których wykryto antygen GDH i toksyny A/B *C. difficile* wyhodowano 47 toksynotwórczych szczepów *C. difficile*. Z jedenastu próbek nie wyhodowano szczepów *C. difficile*. W przypadku grupy kontrolnej (stanowiącej grupę odniesienia do oceny kalprotektyny) nie wyhodowano szczepów *C. difficile*. Wśród wyhodowanych szczepów rozróżniono pięć PCR-rybotypów: RT027 (n=39), RT020 (n=4), RT176 (n=2), RT001 (n=1) i RT017 (n=1). W pięćdziesięciu ośmiu próbkach kału ustalono stężenie kalprotektyny w zakresie od 199,7 $\mu\text{g/g}$ do 1137,1 $\mu\text{g/g}$ kału, co wskazywało na toczący się proces zapalny ($>150 \mu\text{g/g}$ kału). W badaniach ustalono następujące stężenia kalprotektyny w kale pacjentów zakażonych szczepami należącymi do różnych PCR-rybotypów *C. difficile*: RT027 w zakresie od 199,7 $\mu\text{g/g}$ do 1137,1 $\mu\text{g/g}$, RT020 w zakresie od 521,1 $\mu\text{g/g}$ do 1061,4 $\mu\text{g/g}$, RT176 w zakresie od 389,0 $\mu\text{g/g}$ do 1119,4 $\mu\text{g/g}$, RT001 stężenie 1066,4 $\mu\text{g/g}$, RT017 stężenie 963,6 $\mu\text{g/g}$ (Ryc. 1). W grupie kontrolnej, którą stanowiło 17 próbek kału pochodzących od osób zdrowych zakres stężenia kalprotektyny wyniósł 12,1-25,3 $\mu\text{g/g}$ kału, co wykluczyło proces zapalny w jelicie grubym (wartość $<50 \mu\text{g/g}$ kału).

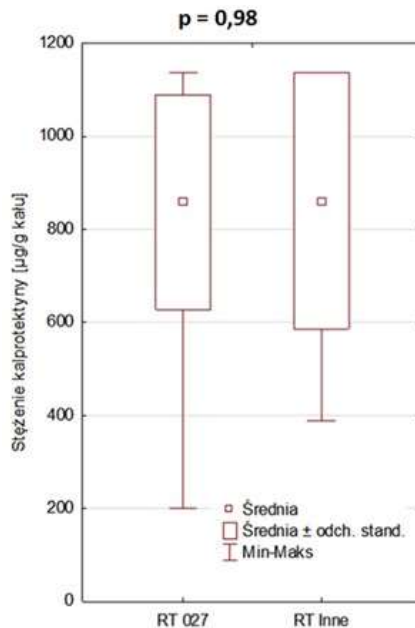
Wyniki naszych badań wykazały zróżnicowany poziom stężenia kalprotektyny w przewodzie pokarmowym u osób z zakażeniem *C. difficile*, przy czym najniższe z tych stężeń było 4-krotnie wyższe niż górna granica przyjęta dla osób zdrowych (50 $\mu\text{g/g}$ kału). W badaniach innych autorów stężenia kałowej kalprotektyny były istotnie wyższe u pacjentów z CDI, niż u osób, u których przyczyna biegunki była inna, oraz u osób zdrowych (1, 5, 7, 13, 15).



Ryc. 1. Stężenia kalprotektyny w próbkach kału pacjentów, z których wyhodowano rybotyp 027 i inne rybotypy *Clostridium difficile*.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie stężenia kalprotektyny w reszkowych próbkach kału, z których wyhodowano szczepy należące do RT027 *C. difficile* w porównaniu do stężenia kalprotektyny w próbkach, w których wykryto szczep *C. difficile* o innym PCR-rybotypie ($p > 0,05$) (Ryc. 2). Wyniki te są podobne do wyników opublikowanych przez Swale i wsp. (13), którzy stwierdzili, że stężenie kalprotektyny

w próbkach kału chorych, od których wyhodowano szczepy RT027 (48%), nie różniło się statycznie od stężenia kalprotektyny, gdzie czynnikiem był inny PCR-rybotyp. Peretz i wsp. (8) zbadali próbki kału od 29 pacjentów z CDI w wieku od 17 do 95 lat. Siedem izolatów (24,1%) *C. difficile* zidentyfikowali jako rybotyp 027, a średni poziom kalprotektyny dla tych próbek kału wyniósł 811,9 $\mu\text{g/g}$ i był znacząco wyższy w porównaniu do pacjentów CDI z innymi PCR-rybotypami *C. difficile*. U tych chorych średni poziom kalprotektyny wyniósł 178,6 $\mu\text{g/g}$. Autorzy stwierdzili znaczący związek między wysokim stężeniem kalprotektyny a występowaniem RT027 *C. difficile*.



Ryc. 2. Porównanie stężeń kalprotektyny w próbkach kału pacjentów, z których wyhodowano RT 027 i inne PCR-rybotypy *Clostridium difficile*.

W naszym przypadku badanie zależności między poziomem stężenia kalprotektyny kałowej a typem genetycznym *C. difficile* (PCR-rybotyp) przeprowadzono na niewielkiej liczbie próbek kału. Wskazana jest zatem kontynuacja badań. Należałoby też wykluczyć inne czynniki towarzyszące, które mogą powodować stan zapalny jelit (11).

PIŚMIENNICTWO

1. Barbut F, Gouot C, Lapidus N i inni. Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with *Clostridium difficile* infection: a case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017; 36: 2423-30.
2. Bidet P, Lalande V, Salauze B i inni. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2484-7.

3. *Borriello SP, Wilcox MH. Clostridium difficile* infections of the gut: the unanswered questions. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl C: 67-9.
4. *Darkoh C, Turnwald BP, Koo HL* i inni. Colonic immunopathogenesis of *Clostridium difficile* infections. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21: 509-17.
5. *Gallo A, Vallone C, Sabatelli L* i inni. Fecal calprotectin in management of *Clostridium difficile* infection: a longitudinal study. *Scand J Gastroenterol* 2017; 24: 1-6.
6. *Gordon D, Young LR, Reddy S* i wsp. Incidence of *Clostridium difficile* infection in patients receiving high-risk antibiotics with or without a proton pump inhibitor. *J Hosp Infect.* 2016; 92: 173-7.
7. *Kim J, Kim H, Oh HJ* i inni. Fecal calprotectin level reflects the severity of *Clostridium difficile* infection. *Ann Lab Med* 2017; 37: 53-7.
8. *Peretz A, Tkhawkho L, Pastukh N* i inni. Correlation between fecal calprotectin levels, disease severity and the hypervirulent ribotype 027 strain in patients with *Clostridium difficile* infection. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 309.
9. *Pituch H, van Leeuwen W, Maquelin K* i inni. Toxin profiles and resistances to macrolides and newer fluoroquinolones as epidemicity determinants of clinical isolates of *Clostridium difficile* from Warsaw, Poland. *J Clin Microbiol* 2007; 1607-10.
10. *Pituch H, Obuch-Woszczyński P, Lachowicz D* i inni. Hospital-based *Clostridium difficile* infection surveillance reveals high proportions of PCR ribotypes 027 and 176 in different areas of Poland, 2011 to 2013. *Euro Surveill* 2015; 20 (38).
11. *Popiel KY, Gheorghe R, Eastmond J* i inni. Usefulness of adjunctive fecal calprotectin and serum procalcitonin in individuals positive for *Clostridium difficile* toxin gene by PCR assay. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3667-9.
12. *Shastri YM, Bergis D, Povse N* i inni. Prospective multicenter study evaluating fecal calprotectin in adult acute bacterial diarrhea. *Am J Med* 2008; 121: 1099-106.
13. *Swale A, Miyajima F, Roberts P* i inni. Calprotectin and lactoferrin faecal levels in patients with *Clostridium difficile* infection (CDI): a prospective cohort study. *PLoS One* 2014; 9: e106118.
14. *Valiente E, Cairns MD, Wren BW.* The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage: a pathogen on the move. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 396-404.
15. *Whitehead SJ, Shipman KE, Cooper M* i inni. Is there any value in measuring faecal calprotectin in *Clostridium difficile* positive faecal samples? *J Med Microbiol* 2014; 63: 590-3.

Otrzymano: 11 X 2018 r.

Adres autora: 02-004 Warszawa, ul. T. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM w Warszawie.

Ocena ochronnego poziomu przeciwciał dla toksyny tężcowej u osób dorosłych w Polsce

Evaluation of the protective level of antibodies to tetanus toxin in adults in Poland

Karolina Śmietañska, Anna Chróst, Natalia Rokosz-Chudziak,
Urszula Roguska, Waldemar Rastawicki

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Oceniono ochronny poziom przeciwciał dla toksyny tężcowej u osób dorosłych w Polsce. U czterech z 493 badanych osób nie wykryto odczynem ELISA firmy IBL poszczepiennych przeciwciał klasy IgG dla toksyny tężcowej. Najwięcej, bo aż 258 osób posiadało przeciwciała na poziomie 0,1-1,0 IU/ml, u 220 osób wykryto te przeciwciała na poziomie 1,0-5,0 IU/ml i tylko u 11 osób na poziomie powyżej 5,0 IU/ml. Co bardzo istotne, wraz z wiekiem badanych osób spadał odsetek wyników z wysokim poziomem przeciwciał dla toksyny tężcowej (> 1,0 IU/ml). Przeprowadzone badania wykazały także wysoki poziom ochronny przeciwko tężcowi u kobiet w ciąży oraz statystycznie znamienne częstsze występowanie wysokiego poziomu przeciwciał dla toksyny tężcowej u mężczyzn niż u kobiet.

Słowa kluczowe: tężec, toksyna tężcowa, *Clostridium tetani*, przeciwciała poszczepienne

ABSTRACT

Introduction: The aim of the research was to assess the protective level of antibodies for tetanus toxin in adults in Poland. The obtained research results provide information on how the protective level of anti-tetanus antibodies is formed after the administration of basic doses and booster doses in people of different ages and gender.

Material and Methods: A total of 493 serum samples collected from 321 adult individuals, 86 blood donors and 86 pregnant women with ages ranging from 20 to 40 years were investigated. Antibody concentrations were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (Tetanus IgG ELISA, IBL International, Germany).

Results: The results showed that among 493 individuals examined, only four were not detected with an IBL ELISA antibody for tetanus toxin. The most, as many as 258 people had antibodies at the level of 0.1-1.0 IU / ml, in 220 people these antibodies were detected at 1.0-5.0 IU / ml and only in 11 people at the level above 5.0 IU / ml. What is very important, the percentage of results with a high level of antibodies to the tetanus toxin (>1.0

IU/ml) decreased with the age of the examined patients. Analysis of the results showed that statistically significantly higher levels of antibodies (>1.0 IU/ml) were detected more frequently in men than in women. The percentage of highly positive results (over 1.0 IU/ml) was significantly higher in pregnant women (73.3%) than in the group of all 169 other women examined (24.3%) and higher than in the group of 50 women (40.0%) and 61 men (57.4%) at a similar age of 19-39 years as pregnant women.

Conclusions: The results we obtained testify generally to a relatively good level of immunization against tetanus in the adult population in Poland up to 50 years of age. A high percentage of older people, especially after the age of 60, with a low level of vaccine anti-tetanus antibodies indicate the desirability of administering doses of the anti-tetanus vaccine in people in this age group.

Key words: tetanus, tetanus toxin, *Clostridium tetani*, post-vaccination antibodies

WSTĘP

Tężec to zakaźna choroba układu nerwowego człowieka wywoływana przez toksyny Gram-dodatnich laseczek *Clostridium tetani*. Głównym rezerwuarem *C. tetani* jest gleba zanieczyszczona odchodami zwierząt, kurz, woda, nawozy, przewód pokarmowy zwierząt (2, 8, 9). Objawy tężca mogą być zróżnicowane i przybierać postać uogólnioną, łagodną lub miejscową (2, 6, 9, 10). Do głównych powikłań tężcowych zaliczamy: niewydolność oddechową, niewydolność serca, upośledzenie umysłowe (2, 13). Szczególnym przypadkiem jest tężec noworodkowy, w którym w 90% przypadków dochodzi do zgonu.

Tężec jest chorobą występującą na całym świecie. Według danych WHO w 2017 roku odnotowano 12476 przypadków tężca na świecie (19). Obecnie największy problem stanowi on na terenie Azji, Afryki i Ameryki Południowej (1, 2, 5, 7, 8). W krajach rozwiniętych, dzięki zachowaniu odpowiednich zasad higieny, powszechnym szczepieniom oraz stosowaniu odpowiednich procedur medycznych (m.in. podawanie immunoglobulin przeciw-tężcowych osobom zgłaszającym się do szpitali z zanieczyszczonymi ranami) liczba odnotowywanych przypadków tężca jest znacznie mniejsza. Według danych Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC) w 2016 roku odnotowano 89 zgłoszeń zachorowań na tężec w krajach Unii Europejskiej, najwięcej we Włoszech - 30, Polsce -12 oraz Hiszpanii -9, z czego 48 przypadków zostało potwierdzonych. Zachorowania na tężec występowały głównie u osób powyżej 65 roku życia oraz częściej u kobiet niż u mężczyzn (4). W Polsce w 2017 roku odnotowano 12 przypadków zachorowań na tężec (21).

Najlepszą metodą zapobiegania tężcowi jest zastosowanie immunoprofilaktyki u osób zdrowych poprzez uodpornienie czynne (szczepienia) (16,22). W Polsce zarejestrowanych jest 17 szczepionek zawierających komponent tężcowy (dane Zakładu Badania Surowic i Szczepionek NIZP-PZH). Występuje on jako jedyny antygen w szczepionce lub też w skojarzeniu z innymi antygenami: błonica-tężec, błonica-tężec-krztusiec, błonica-tężec-polio, błonica-tężec-krztusiec-polio, błonica-tężec-krztusiec-polio-haemophilus typu b, błonica-tężec-krztusiec-HBV-polio-haemophilus typu b, dur brzuszny-tężec. Brak jest natomiast szerszych danych w zakresie możliwych różnic w immunogenności składnika tężcowego w różnych szczepionkach.

U osób nieszczepionych lub posiadających zbyt niski poziom przeciwciał przeciwtężcowych (np. na skutek braku szczepień przypominających lub zaburzeń układu immunologicznego) występuje ryzyko wystąpienia tężca w przypadku zranienia. Szczepienia przeciwtężcowe znajdują się w Obowiązkowym Programie Szczepień i obejmują cztery dawki szczepienia podstawowego w wieku: 2, 4, 5-6 oraz 16-18 miesięcy oraz 3 szczepienia przypominające, w wieku 6, 14 i 19 lat (3, 4, 13, 15.). Tak więc, zgodnie z kalendarzem szczepień, zakończenie cyklu uodparniania kończy się w wieku 19 lat. W literaturze fachowej, wielu autorów zaznacza, iż ochronny poziom poszczepiennych przeciwciał w kierunku tężca utrzymuje się średnio przez 10 lat i w celu podtrzymania ochronnego poziomu zaleca się podanie dawek przypominających u dorosłych co 10 lat (12, 13, 14). Z powodu rzadko wykonywanych szczepień przypominających u osób dorosłych, do głównej grupy ryzyka zachorowania na tężec należą osoby po 60 roku życia (12). Do grupy ryzyka zalicza się również osoby, które nie odbyły pełnego cyklu szczepień ochronnych przewidzianych w Programie Szczepień Ochronnych. Szczególną grupę stanowią kobiety w ciąży, ponieważ obecny u nich poziom przeciwciał przeciwtężcowych ma ogromne znaczenie dla noworodka. Noworodki są chronione przed tężcem dzięki odporności biernej zapewnionej przez matczyne przeciwciała, które przenikają przez łożysko. Około 80% matczynych przeciwciał jest wciąż obecnych u niemowląt miesiąc po urodzeniu, dzięki czemu, w przypadku gdy matka posiada wysoki poziom przeciwciał przeciwtężcowych, ochrona jest utrzymana do chwili odbycia cyklu szczepień podstawowych i jest maksymalna w okresie największej podatności na zachorowanie, kiedy może dojść do zakażenia pępka (17). W związku ze specyfiką wykonywanej pracy na zakażenia *C. tetani* narażone są osoby pracujące w służbie zdrowia, w służbie wojskowej, hodowcy zwierząt, pracownicy oczyszczalni ścieków, rolnicy, ogrodnicy (3). *Nemati* i wsp. (11) wskazali jeszcze jedną istotną grupę ryzyka, którą stanowią osoby z cukrzycą, u których często występują owrzodzenia. Trudno gojąca się stopa cukrzycowa może stanowić drogę zakażenia *C. tetani* i w konsekwencji tężec.

Celem rozpoczętego w NIZP-PZH cyklu badań jest ocena poziomu poszczepiennych przeciwciał przeciwtężcowych w populacji polskiej. Zakładamy, że uzyskane wyniki badań dostarczą informacji jak kształtuje się ochronny poziom przeciwciał przeciwtężcowych po podaniu dawek podstawowych oraz dawek przypominających u osób w różnym wieku oraz jaki rodzaj szczepionki powinien być rekomendowany. Pozwoli to na weryfikację poprawności przyjętego schematu szczepień przeciwko tężcowi oraz przede wszystkim dostarczy informacji kiedy należy stosować szczepienia przypominające u osób dorosłych.

W aktualnie prezentowanej pracy, będącej pierwszą z cyklu, skupiono się na występowaniu ochronnego poziomu przeciwciał dla toksyny tężcowej u osób dorosłych w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Głównym przedmiotem badań było 321 próbek surowicy uzyskanych od osób dorosłych w różnym wieku. Próbki te zostały przysłane do Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w celu wykonania rutynowych badań w kierunku różnych zakażeń bakteryjnych. Do badań wybrano próbki surowicy w których nie wykryto podwyższonego poziomu przeciwciał w przeprowadzonych badaniach. Ze względu na fakt przekazywania poszczepiennych przeciwciał klasy IgG przez łożysko, co ma znaczenie w zapobieganiu tężca noworodkowego, badaniom

poddano również 86 kobiet w ciąży. W badanej grupie osób wiek kobiet w ciąży wynosił od 20 do 40 lat. Osobną grupę stanowiło 86 klinicznie zdrowych dorosłe osób – krwiodawców. Nie dysponowano danymi co do wieku krwiodawców.

Odczyn immunoenzymatyczny ELISA. Badania przeprowadzono pośrednim testem immunoenzymatycznym ELISA firmy IBL International przeznaczonym do ilościowego oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgG dla toksyny tężcowej *Clostridium tetani*. Badanie wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Poziom przeciwciał w jednostkach międzynarodowych (IU/mL) wyznaczano z krzywej wykreślonej na podstawie badania pięciu surowic kontrolnych - kalibratorów rekomendowanych przez WHO (1st International Standard TE-3). Odczytu absorbancji dokonywano przy długości fali 450 nm.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W celu określenia ochronnego poziomu poszczepiennych przeciwciał dla toksyny tężcowej zbadano 493 próbek surowicy uzyskanych od osób dorosłych zamieszkałych w Polsce. W tabeli I przedstawiono występowanie poszczepiennych przeciwciał klasy IgG dla toksyny tężcowej u 321 osób dorosłych w Polsce w poszczególnych grupach wiekowych. Zgodnie z interpretacją podaną przez producenta testu IBL każdy wynik uzyskany w odczynie ELISA zakwalifikowano do jednego z czterech zakresów: <0,1 IU/ml (zalecane wykonanie podstawowej immunizacji), 0,1-1,0 IU/ml (wystarczająco wysoki poziom ochronny, zalecane badanie kontrolne po roku lub dwóch latach), 1,0-5,0 IU/ml (wystarczająco wysoki poziom ochronny, zalecane badanie kontrolne po 2-4 latach), >5,0 IU/ml (wystarczająco wysoki poziom ochronny, zalecane badanie kontrolne po 4-8 latach). Ogółem, tylko u czterech z 321 badanych osób dorosłych nie wykryto odczynem ELISA firmy IBL przeciwciał dla toksyny tężcowej. Najwięcej, bo aż 195 osób posiadało przeciwciała na poziomie 0,1-1,0 IU/ml, u 116 osób wykryto te przeciwciała na poziomie 1,0-5,0 IU/ml i tylko sporadycznie (6 osób) na poziomie powyżej 5,0 IU/ml. Co bardzo istotne, wraz z wiekiem badanych osób spadał odsetek wyników z wysokim poziomem przeciwciał dla toksyny tężcowej (> 1,0 IU/ml).

Tabela I. Występowanie przeciwciał poszczepiennych klasy IgG w kierunku tężca u osób dorosłych

Wiek badanych osób (lata)	Liczba próbek (321)	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto poszczepienne przeciwciała klasy IgG w kierunku tężca (IU/ml)			
		< 0,1	0,1-1,0	1,0-5,0	>5,0
19-29	51	-	29 (56,9%)	22 (43,1%)	-
30-39	60	-	27 (45%)	33 (55%)	-
40-49	61	1 (1,6%)	26 (42,6%)	30 (49,2%)	4 (6,6%)
50-59	51	1 (2%)	34 (66,6%)	15 (29,4%)	1 (2%)
60-69	57	1 (1,8%)	46 (81%)	10 (17,5%)	-
>69	41	1 (2,4%)	33 (80,5%)	6 (14,6%)	1 (2,4%)
Razem	321	4	195	116	6

Ze względu na fakt, iż najczęściej wykrywano przeciwciała na poziomie 0,1-1,0 IU/ml przeanalizowano szczegółowo 195 wyników uzyskanych w odczynie ELISA w tym przedziale (Tabela II). Okazało się, że aż w połowie przypadków poziom przeciwciał oscy-

lował na granicy wykrywalności w odczynie ELISA i wynosił od 0,1 do 0,2 IU/ml. Co więcej, u osób w wieku powyżej 50 lat życia przeciwciała na tak niskim poziomie były zdecydowanie częściej wykrywane niż u młodszych osób, w wieku 19-49 lat.

Tabela II. Występowanie przeciwciał poszczepiennych klasy IgG w kierunku tężca u osób dorosłych

Wiek badanych osób (lata)	Liczba próbek (195) 0,1-1,0 IU/ml	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto poszczepienne przeciwciała klasy IgG w kierunku tężca (IU/ml)				
		0,1-0,2	0,3-0,4	0,5-0,6	0,7-0,8	0,9-1,0
19-29	29	8(27,6%)	10 (34,5%)	5 (17,2%)	4 (13,8%)	2 (6,9%)
30-39	27	6 (22,2%)	11 (40,7%)	5 (18,5%)	3 (11,1%)	2 (7,4%)
40-49	26	12 (46,1%)	6 (23,1%)	4 (15,4%)	3 (11,5%)	1 (3,8%)
50-59	34	20 (58,8%)	7 (20,6%)	4 (11,8%)	2 (5,9%)	1 (2,9%)
60-69	46	26 (56,5%)	6 (13%)	4 (8,7%)	7 (15,2%)	3 (6,5%)
>69	33	26 (78,8%)	1 (3%)	3 (9,1%)	1 (3%)	2 (6,1%)
Razem	195	98	41	25	20	11

W tabeli III porównano ochronny poziom poszczepiennych przeciwciał klasy IgG dla toksyny tężcowej u 169 kobiet i 152 mężczyzn. Analiza wyników wykazała, że statystycznie istotnie częściej wykrywano wysoki poziom przeciwciał (>1,0 IU/ml) u mężczyzn niż u kobiet. W prowadzonych przez nas badaniach nie mieliśmy możliwości sprawdzenia danych socjoekonomicznych pacjentów, ale nie można wykluczyć, że jednym z powodów wyższego poziomu ochronnych przeciwciał przeciwtężcowych u mężczyzn jest wykonywany przez nich zawód i związana z tym konieczność szczepień przypominających. Podobne obserwacje o wyższym poziomie przeciwciał przeciwtężcowych u mężczyzn niż u kobiet zamieszkałych w różnych europejskich krajach poczynili *Weinberger* i wsp. (18). Według tych autorów może to być związane ze szczepieniami podczas pełnienia przez mężczyzn służby wojskowej oraz częstszym doszczepieniem się po urazach. Z drugiej strony, według raportu ECDC z 2016 roku, zachorowania na tężec występowały częściej u mężczyzn niż u kobiet. Wyjątek stanowiła grupa osób w wieku powyżej 65 roku życia, w której liczba odnotowanych zachorowań na tężec w krajach Europejskich była większa u kobiet (40 przypadków) niż u mężczyzn (23 przypadki) (4).

Tabela III. Występowanie przeciwciał poszczepiennych klasy IgG w kierunku tężca w zależności od płci

Płeć	Liczba próbek (321)	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała poszczepienne klasy IgG w kierunku tężca (IU/ml)			
		< 0,1	0,1-1,0	1,0-5,0	>5,0
Kobiety	169	4 (2,4%)	124 (73,3%)	40 (23,7%)	1 (0,6%)
Mężczyźni	152	-	71 (46,7%)	76 (50%)	5 (3,3%)
Razem	321	4	195	116	6

Jak wynika z przeprowadzonych przez nas badań, we wszystkich 86 badanych próbkach surowicy uzyskanych od kobiet w ciąży wykryto poszczepienne przeciwciała IgG na poziomie powyżej 0,1 IU/ml, które zapewniają tym samym wystarczający poziom

ochronny przeciw toksynie tężcowej (Tabela IV.). Również odsetek wyników wysoko dodatnich (powyżej 1,0 IU/ml) był znacznie wyższy u kobiet w ciąży (53,5%) niż ogółem w grupie wszystkich 169 pozostałych zbadanych kobiet (24,3%) oraz wyższy niż w grupie 50 kobiet (40,0%) w podobnym wieku 19-39 lat co kobiety w ciąży. Taki wynik badania może świadczyć o tym, że kobiety planujące ciążę lub będące już w ciąży częściej poddają się zalecanym, przypominającym szczepieniom w kierunku tężca w porównaniu do ogółu dorosłej populacji. *Thwaites* i wsp. (17) wskazuje jednoznacznie, iż kobiety w ciąży, które nie odbyły pełnej immunizacji w kierunku tężca wymagają dwukrotnego szczepienia w odstępie miesiąca w celu utworzeniu ochronnego poziomu przeciwciał. Ochronny poziom przeciwciał matki jest bardzo istotny dla noworodka ponieważ przeciwciała klasy IgG przekazywane są przez łożysko i zapobiegają tężcowi noworodka (19). Program Szczepień Ochronnych na rok 2018 w Polsce, jak również organizacje międzynarodowe, takie jak Amerykańskie Towarzystwo Położnictwa i Ginekologii – ACOG, rekomendują szczepienia uzupełniające dla kobiet planujących ciążę bądź będące w ciąży (zaleca się stosowanie szczepionki Tdap kobietom będącym w 27-36 tygodniu ciąży) (3,19). Wysoki stopień zaszczepienia kobiet w ciąży przeciw tężcowi, sprawia że tężec noworodkowy został całkowicie wyeliminowany w naszym kraju (22).

Tabela IV. Występowanie przeciwciał poszczepiennych klasy IgG w kierunku tężca u kobiet w ciąży bądź planujące ciążę.

Kobiety w ciąży bądź planujące ciążę	Liczba próbek (86)	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała poszczepienne klasy IgG w kierunku tężca (IU/ml)			
		< 0,1	0,1-1,0	1,0-5,0	>5,0
	86	-	40 (46,5%)	45 (52,3%)	1 (1,2%)

W tabeli V przedstawiono występowanie poszczepiennych przeciwciał przeciw tężcowym w grupie 86 klinicznie zdrowych dorosłych osób – krwiodawców. Odsetek osób, u których wykryto wysoki poziom przeciwciał poszczepiennych (>1,0 IU/ml) u krwiodawców był wyraźnie wyższy (73,3%) niż odsetek osób z takim samym poziomem przeciwciał w zbadanej grupie 321 osób dorosłych (38,0%). Wynika to zapewne z faktu, że krwiodawcy to w większości młodzi mężczyźni, szczególnie dbający o stan swojego zdrowia.

Tabela V. Występowanie przeciwciał poszczepiennych klasy IgG w kierunku tężca u osób zdrowych (krwiodawcy)

Osoby zdrowe (krwiodawcy)	Liczba próbek (86)	Liczba i odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała poszczepienne klasy IgG w kierunku tężca (IU/ml)			
		< 0,1	0,1-1,0	1,0-5,0	>5,0
	86	-	23 (26,7%)	59 (68,6%)	4 (4,7%)

Podsumowując wyniki badań należy stwierdzić, iż w zbadanych przez nas 493 próbkach surowicy uzyskanych od osób dorosłych tylko w 4 próbkach nie wykryto ochronnych przeciwciał dla toksyny tężcowej. Jednakże, przy użyciu testu ELISA firmy IBL, w badanej grupie aż u 110 osób (22,3%) przeciwciała te wykryto na bardzo niskim, ledwie

wykrywalnym poziomie 0,1-0,2 IU/ml, a u kolejnych 58 osób (11,8%) na poziomie 0,3-0,4 IU/ml. Nie jest wykluczone, że przy użyciu testu ELISA innej firmy uzyskano by nieco odmienne wyniki i w niektórych tych próbkach nie stwierdzono by obecności poszczepionych przeciwciał nawet w najniższym poziomie 0,1 IU/ml.

Z wytycznych WHO wynika, iż wykrycie, przy użyciu testu ELISA, u pacjenta poszczepionych przeciwciał przeciwtężcowych na poziomie 0,1-0,2 IU/ml powinno być uznawane za wystarczająco wysoki poziom ochronny (19). Jednak w celu podjęcia decyzji o wykonaniu przypominających szczepień ochronnych, poza wynikami badań serologicznych należy uwzględnić dane z wywiadu o przeprowadzonych wcześniej szczepieniach.

Uzyskane przez nas wyniki świadczą generalnie o stosunkowo dobrym poziomie uodpornienia przeciwko tężcowi w populacji osób dorosłych w Polsce do 50 roku życia. Wysoki odsetek osób starszych, zwłaszcza po 60 roku życia, z niskim poziomem poszczepionych przeciwciał przeciwtężcowych świadczy o celowości podawania przypominających dawek szczepionki przeciwtężcowej u osób w tej grupie wiekowej.

Praca wykonana w ramach zadania nr 6/EM.1 na rok 2018, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

PIŚMIENNICTWO

1. *Campbell JJ, Lam TM, Huynh TL* i inni. Microbiologic characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium tetani* isolated from wounds of patients with clinically diagnosed tetanus. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 827-31.
2. *Cook T.M, Protheroe R.T, Handel, J.M.* Tetanus: a review of the literature. *Brit J Anaesth* 2001; 87: 477-87
3. Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia. Warszawa dnia, 19 października 2015r. Poz.63 Komunikat Głównego Inspektora Sanitarnego z dnia 16 października 2015 w sprawie Programu Szczepień Ochronnych na rok 2016.
4. ECDC: Surveillance report. Annual Epidemiological Report for 2016. Tetanus. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-tetanus-rev.pdf
5. *Farrar JJ, Yen LM, Cook T* i inni. Tetanus. *Neurological Aspects of Tropical Disease. Neurol Neurosurg Psych* 2000; 69: 292-301.
6. *Kłapeć T, Stroczyńska-Sikorska M.* Tężec-choroba wciąż aktualna w Polsce. *Medycyna Ogólna* 2010; 16: 340-6.
7. *Kuszeński K.* Szczepionka przeciwko tężcowi. W: *Wakcynologia. Red. Magdzik W, Naruszewicz-Lesiuk D, Zieliński A.* Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała 2007, 452-5
8. *Kuszeński K.* Tężec. W: *Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka. Wydanie VI. Red. Magdzik W, Naruszewicz-Lesiuk D, Zieliński A.* Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała 2007, 291-4.
9. *Melville S.* Clostrida: diarrheal disease, tissue infection, botulizm, and tetanus. W: *Mechanisms of Microbial Disease. Red. Engleberg NC, DiRita V, Dermody TS.* Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore 2007; 234-5.
10. *Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA,* Clostridium. W: *Mikrobiologia. Red. Wyd. Polskiego: Przondo-Modarska A, Martirosian G, Szkaradkiewicz A, Elsevier Urban&*

Partner, Wrocław 2011, 371-3.

11. *Nemati M, Zarrin M, Mir-Abdollahi S i wsp.*, Lower serum level of anti-tetanus toxin antibodies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Indones J Intern Med* 2014; 46: 44-50.
12. *Paradowska-Stankiewicz I.* Szczepienia przypominające przeciw błonicy i krztuścowi. *Zakażenia* 1/2012.
13. Portal Wakcynologiczny „Wydział Szczepień”; adres źródłowy www.wydzialszczepin.pl (z dnia 29.11.2013).
14. *Prygiel M, Mosiej E, Zasada A.A.* Szczepienie kobiet w ciąży. *Med Dośw Mikrobiol*, 2016; 68: 225-234
15. *Śmietańska K, Rokosz-Chudzik N, Rastawicki W.* Charakterystyka *Clostridium tetani* i laboratoryjna diagnostyka tężca. *Med Dośw Mikrobiol*, 2013; 65: 285-295
16. *Taylor AM.* Tetanus. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 2006; 6: 101-4
17. *Thwaites CL, Loan HT.* Eradication of tetanus. *British Med Bull* 2015; 116: 69-77.
18. *Weinberger B. i wsp.* Protection against Tetanus and Diphtheria in Europe: The impact of age, gender and country of origin based on data from the MARK-AGE Study. *Experimental Gerontology*, Vol. 105, 2018: 109-12.
19. WHO Immunological Basis for Immunization Series Module 3: Tetanus Update 2018 (<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275340/9789241513616eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>)
20. WHO. Tetanus (total) reported cases. (http://apps.who.int/immunization_monitoring/global_summary/timeseries/tsincidencettetanus.tml)
21. Zakład Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru. Główny Inspektorat Sanitarny Departament Zapobiegania oraz Zwalczania Zakażeń i Chorób Zakaźnych u Ludzi „Choroby Zakaźne i zatrucia w Polsce w 2017 roku”
22. *Zieliński A:* Tężec w Polsce w 2010 roku. *Przegl Epidemiol* 2002; 56: 335-8

Otrzymano: 15 X 2018 r.

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

Nowe pochodne sulfonowe i sulfanylowe o działaniu przeciwgrzybicznym

New sulfone and sulfanyl derivatives with antifungal activity

Małgorzata Gizińska^a, Marzena Połaska^b, Zbigniew Ochal^c, Monika Staniszevska^{a*}^aNational Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland^bDepartment of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology, Warsaw, Poland^cFaculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

Wzrastająca częstotliwość występowania kandydoz i trudność ich leczenia stwarzają potrzebę poszukiwania nowych antymikotyków ukierunkowanych na czynniki wirulencji *Candida albicans*. W prezentowanej pracy, przy użyciu metody mikrorozcieńczeń M27-A3, zidentyfikowano nowe pochodne sulfonowe i sulfanylowe aktywne wobec *C. albicans*. Wykazano, że delecje w genach *SAP* kodujących izoenzymy proteazy aspartylowej warunkują mutantom *sap*Δ zwiększoną wrażliwość na badane związki. Nowe pochodne siarkoorganiczne (1, 5 oraz 6) efektywnie hamowały morfogenezę *C. albicans* w warunkach indukujących formowanie strzępek. Efektem końcowym prowadzonych analiz było wytypowanie wiodącej struktury 6 do dalszej optymalizacji.

Słowa kluczowe: *Candida albicans*, pochodne sulfonowe, zjadliwość

ABSTRACT

Introduction: Increasing occurrence of fungal infections raises the need to develop novel antifungal agents. In this context, an inhibition of morphological switch may provide an alternative approach to find compounds with a potential to control the *Candida albicans* infections.

Methods: A series of 17 sulfone and sulfanyl derivatives was synthesized and evaluated for activity against the *C. albicans* wild type (SC5314, ATCC) and *SAP*-deficient mutant strains using the broth microdilution method M27-A3. Afterwards, phase-contrast microscopy was applied to evaluate the inhibition of fungal morphogenesis under the influence of randomly selected active compounds: 1, 5 and 6.

Results: By *in vitro* susceptibility testing of *C. albicans*, we identified the effective antifungal agents displaying moderate-to-good activity. Newly synthesized sulfanyl and sulfone derivatives strongly inhibited the *C. albicans* morphogenetic transition under the hyphae inducing conditions.

Conclusions: The leading compound 6 has the potential to be used as a base structure in antifungal drug development, however further structural optimization and toxicity studies are required.

Key words: *Candida albicans*, sulfone derivatives, virulence

INTRODUCTION

Candida albicans commonly colonizes the skin and mucosal surfaces of healthy individuals; however in immunocompromised hosts this opportunistic pathogen may cause life-threatening invasive infections (9). Invasive candidiasis (IC) is associated with high mortality rates (46–75%), even with treatment using available antifungals (16). Currently, there are only four classes of antifungals used for the IC treatment, such as the following: polyenes, azoles, echinocandins, and flucytosine (11). Classical antifungals were designed to exert either fungicidal or fungistatic effects by interfering with essential processes of pathogenic fungi (8, 12). Therefore their intensive therapeutic use and prolonged treatment contribute to a selection for drug-resistant isolates (11). Recently, interfering with fungal virulence factors became a new paradigm in the development of new antifungal compounds (8, 12). This alternative approach does not pose a direct selective pressure for drug resistance, since virulence determinants that contribute to *C. albicans* pathogenicity are generally considered as not essential for the survival of this pathogen (8). Among *C. albicans* features that contribute to pathogenesis, filamentation and secreted hydrolytic enzymes represent promising antifungal targets (16). Morphogenesis represents an important virulence trait of *C. albicans*, since the locked in either yeast or hyphal forms mutants are attenuated virulence in IC (2, 12). The ability to reversibly switch between different morphologies (yeast, germ-tube, pseudohyphae, or true hyphae) is crucial for adaptation and persistence in different environmental niches inside the host (16). Both yeast and hyphal cells are found in the *C. albicans* infected organs, indicating that different morphologies are important for the virulence and have distinct functions during infection (2). In addition, the yeast-to-hyphae transition is necessary for the biofilm formation and maintenance (9, 12). The yeast forms are important for the establishment and dispersion of biofilms, while the hyphal morphologies stabilize the biofilm structure (9). Additionally, the hyphae formation is linked to the expression of subset of genes encoding the virulence determinants, such as the following: adhesins (Hwp1, Als3), secreted aspartyl proteases (Sap4-6) and other hyphae-associated proteins (Ece1, Hyr1) (8).

In this context, a series of 17 sulfone derivatives were synthesised and evaluated against *C. albicans*. The study aimed to determine: (a) which compound possesses a good anti-*Candida* activity and could be used as a base scaffold in the development of antifungal agents; (b) effect of *C. albicans* mutations in the *SAP1-3*, *SAP4-6* and *SAP9-10* genes on the antimicrobial activity of sulfone derivatives *in vitro*; (c) morphogenesis-inhibition effect of tested derivatives under hyphae inducing conditions.

MATERIAL AND METHODS

Fungal strains, media and growth conditions. All *C. albicans* strains used in the study are listed in Table I. Fungal strains were stored on ceramic beads in a Microbank tube (Prolab Diagnostics, Canada) at -70°C. Prior to the respective examinations, routine cultures were conducted at 30 °C for 18 h in the yeast extract–peptone–dextrose (YEPD) medium (Bacto peptone 2%, Yeast Extract 1%, Dextrose 2%).

Synthesis of sulfone and sulfanyl derivatives used in the study. The sulfur-organic compounds evaluated in the present study were listed in Table II. All compounds were synthesized at the Faculty of Chemistry of the Warsaw University of Technology (Poland). The synthetic pathway for the synthesis of the target compounds had been previously described (10).

Table I. Strains used in the study

Strain	Genotype	Reference
SC5314	Wild type	(5)
sap1-3 Δ	<i>sap1</i> Δ :: FRT/ <i>sap1</i> Δ :: FRT; <i>sap2-1</i> Δ :: FRT/ <i>sap2-2</i> Δ :: FRT; <i>sap3</i> Δ :: FRT/ <i>sap3</i> Δ :: FRT	(7)
sap6 Δ	<i>sap6-1A</i> ::FRT/ <i>sap6-2A</i> ::FRT	(7)
sap4-6 Δ	<i>sap4-1</i> Δ :: FRT/ <i>sap4-2</i> Δ :: FRT; <i>sap5-1</i> Δ :: FRT/ <i>sap5-2</i> Δ :: FRT; <i>sap6-1</i> Δ :: FRT/ <i>sap6-2</i> Δ :: FRT	(7)
sap9/10 Δ	<i>ura3</i> Δ :: <i>imm434/ura3</i> Δ :: <i>imm434 sap10</i> Δ :: <i>hisG/sap10</i> Δ :: <i>hisG sap9</i> Δ :: <i>hisG/sap9</i> Δ :: <i>hisG-URA3-hisG</i>	(1)

Antifungal activity assay against *C. albicans*. Susceptibility of the planktonic cells of *C. albicans* SC5314 to the new sulfone derivatives was determined using the broth microdilution method M27-A3 (3). The final inoculum of 1.8×10^3 cfu/mL of PBS was prepared in the synthetic RPMI 1640 medium at pH 7.0 buffered with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). Compounds' concentrations (ranging from 0.0313 to 160 $\mu\text{g/mL}$) were prepared with the stock solution of compounds (1600 $\mu\text{g/mL}$) dissolved in ethanol at final concentration of 0.09%. Amphotericin B (Sigma–Aldrich, USA) at 0.5 $\mu\text{g/mL}$ was used as a reference antifungal. Microtiter plates were incubated at 35°C without agitation for 18 h. Ethanol at 0.09 % (v/v) was used as a control, unable to inhibit the growth of *C. albicans*. According the criteria described in the method M27-A3, minimal inhibitory concentration (MIC), defined as the lowest compound concentration that yielded no visible growth, it was determined visually after 18 h of incubation (3). Tests were performed in triplicate and results were confirmed in two separate experiments on different days. Activity of benzothiazole, benzimidazole, and nitrophenyl derivatives displaying different MIC against the wild type (*wt*) strain was further evaluated against *C. albicans sap* Δ mutants.

Phase-contrast microscopy (Docuval, Carl Zeiss, Germany). Phase-contrast microscopy was applied to evaluate the inhibition of *C. albicans* morphogenesis under influence of randomly selected active compounds: 1, 5, 6, and 7. Samples were prepared as described previously (14). Briefly, the cells of SC5314 were pre-treated with the selected compounds at concentrations ranging from 4 to 16 $\mu\text{g/mL}$ for 18 h, according to the reference M27-A3 method (3). Afterwards, samples were washed once and suspended in 250 μL of water. Next, 50 μL of the suspension were pipetted onto the microscope glass slides and examined under phase-contrast microscope (Docuval, Carl Zeiss, Germany). The control morphologies were prepared by the pre-treatment of SC5314 with 0.09% ethanol.

Scanning electron microscope (SEM, Hitachi S-5500, Japan).

The lead compound **6** was further examined against the mature biofilm of the *C. albicans wt* and *SAP4-6* mutants generated on the Caco-2 monolayer. Briefly, the Caco-2 cell line was seeded at the density of 1.2×10^5 cells/mL of EMEM on cover sleeps located in the bottom of 24-well-plates (Corning, USA) (13). Cells were cultured in the EMEM medium (10 vol. % FCS, 1 mM pyruvic acid; ATCC, USA) without antibiotics or antifungal agents for 18 h. To assess the influence of **6** on the *C. albicans* biofilm formation, the Caco-2 cell line after 21-day post seeding was inoculated with $1.0-1.2 \times 10^5$ /mL of the log-phase yeast cells of SC5314 ATCC. Afterwards, the biofilms were treated with **6** at 16 or 8 $\mu\text{g/mL}$ separately for 18 h (37°C in 5 vol % CO₂). After double washing with PBS, samples were

prepared as described previously Staniszevska et al. (15). Subsequently, cells were fixated with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 18 h at a low temperature (5–6°C); carried out with 2% osmium tetroxide (2 h at room temperature); dehydrated with series of ethanol gradients and acetone until they were dried by the critical point method in liquid CO₂. Then, the specimens were coated with gold in a vacuum evaporator and examined with SEM. Images were assembled with Photoshop (Adobe Photoshop CS3 Extended).

RESULTS

In the study, the series of new sulfanyl and sulfone derivatives were synthesized and screened for activity against *C. albicans*. The structures and yields of the examined compounds are presented in Table II. Among benzothiazole derivatives only compound 1 was active against *C. albicans*, whereas replacement of propanone group with phenylethanone- (as in 2) or ethanethioate- moieties (as in 3) resulted in the activity loss of these compounds. Interestingly, benzoxazole (named 5) displayed 2-fold higher antifungal activity than an equivalent agent with the benzothiazol ring (named 1).

Table II. The sulfone derivatives evaluated in this study

No.	Compound	Structure	Yield (%)	Chemical Formula	MIC* μg/mL
1	1-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfanyl) propan-2-one		87	C ₁₀ H ₉ NOS ₂	80
2	2-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfanyl) -1-phenylethanone		84	C ₁₅ H ₁₁ NOS ₂	>160
3	S-1,3-benzothiazol-2-yl ethanethioate		87	C ₉ H ₇ NOS ₂	>160
4	1-(1H-benzimidazol-2-ylsulfanyl) propan-2-one		93	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ OS	>160
5	1-(1,3-benzoxazol-2-ylsulfanyl) propan-2-one		82	C ₁₀ H ₉ NO ₂ S	40
6	5-(chloromethylsulfonyl)-1-methyl-2-trifluoromethyl -1H-benzimidazole		79	C ₁₀ H ₈ ClF ₃ N ₂ O ₂ S	20

7	2-amine-5-(trifluoromethylsulfonyl)-1 <i>H</i> -benzimidazole		79	$C_8H_6F_3N_3O_2S$	40
8	5-(chloromethylsulfonyl)-1,2-dimethyl-1 <i>H</i> -benzimidazole		91	$C_{10}H_{11}ClN_2O_2S$	>160
9	4-chloro-3-nitrophenylmethyl sulfone		92	$C_7H_6ClNO_4S$	20
10	bromodichloromethyl 4-(2,4-dichlorophenoxy)-3-nitrophenyl sulfone		88	$C_{13}H_6BrCl_4NO_5S$	40
11	4-chloro-3-nitrophenylchloromethyl sulfone		89	$C_7H_5Cl_2NO_4S$	>160
12	chloromethyl 4-(2,6-dichlorophenoxy)-3-nitrophenyl sulfone		78	$C_{13}H_8Cl_3NO_5S$	>160
13	1-(4-bromodichloromethylsulfonyl)-2-nitrophenyl-4-methylpiperazine		85	$C_{12}H_{14}BrCl_2N_3O_4S$	40
14	4-(difluoromethylsulfonyl)- <i>N</i> -(2-methylpropyl)-2-nitroaniline		88	$C_{11}H_{14}F_2N_2O_4S$	40
15	4-(bromodichloromethylsulfonyl)- <i>N</i> -methyl-2-nitro- <i>N</i> -phenylaniline		91	$C_{14}H_{11}BrCl_2N_2O_4S$	>160
16	2-(4-chloro-3-nitrophenylsulfonyl)acetamide		84	$C_8H_7ClN_2O_5S$	>160
17	1-(4-(chloromethyl)sulfonyl-2-nitrophenyl)pyrrolidine		83	$C_{11}H_{13}ClN_2O_4S$	>160

Legend: MIC was evaluated after 18 h of incubation

In case of benzimidazoles, derivatives bearing fluorine atoms in the main ring (as in 6) or in halogenomethylsulfonyl moiety (as in 7) displayed good antifungal activity. However, this activity was fully diminished by the substitution of trifluoromethyl with the methyl moiety in the main ring (8). Antifungal properties of nitrophenyl sulfones were attributed to the presence of methylsulfonyl group (9). Interestingly, a single substitution of hydrogen with the chlorine moiety fully diminished the antifungal potential of resultant chloromethyl sulfone (11). Contrariwise, a further addition of halogens to the halogenomethyl sulfonyl group, such as bromine (as in 10 and 13) or fluorine (as in 14) atoms enhanced the antifungal potential of tested derivatives. In order to test the influence of the *C. albicans* *SAP* gene deletion on the susceptibility to new derivatives, randomly selected (active and unactive) benzothiazole, benzimidazole, and nitrophenyl sulfones were further screened against the *C. albicans* *sap* Δ strains. Changes in the mutant's susceptibility to sulfone derivatives were presented in Table III. Interestingly, the *SAP* gene deletion did not impact the activity of the tested benzimidazole sulfones. While, deletion of *SAP9/10* increased susceptibility from 2- (1) to 4-fold (3) to benzothiazole derivatives, lack of the hyphae-associated *SAP4-6* genes increased susceptibility to nitrophenyl sulfones.

Table III. Susceptibility of *C. albicans* *SAP*-deficient strains to sulfone derivatives after 18-h incubation

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of Compounds						
	1	3	6	8	11	14	17
SC5314	80	>160	20	>160	>160	40	>160
<i>sap1-3</i> Δ	80	160	20	>160	160	40	>160
<i>sap4-6</i> Δ	80	80	20	>160	40	20	160
<i>sap9/10</i> Δ	40	40	20	>160	>160	20	>160

Legend: 1 means 1-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfonyl)propan-2-one; 3 means 2-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfonyl)-1-phenylethanone; 6 means 5-(chloromethylsulfonyl)-1-methyl-2-trifluoromethyl-1*H*-benzimidazole; 8 means 5-(chloromethylsulfonyl)-1,2-dimethyl-1*H*-benzimidazole; 11 means 4-chloro-3-nitrophenylchloromethyl sulfone; 14 means 4-(difluoromethylsulfonyl)-*N*-(2-methylpropyl)-2-nitroaniline; 17 means 1-(4-(chloromethyl) sulfonyl-2-nitrophenyl)pyrrolidine.

Since yeast-to-hyphae transition represents a major virulence factor of *C. albicans*, we examined the ability of chosen benzothiazole, benzimidazole, and benzoxazole sulfone derivatives to inhibit the yeast-to-hyphae transition. Phase-contrast microscopy was applied to visualize an effect of sub-MIC concentrations of selected derivatives: 1, 5, 6, and, 7 on the *C. albicans*' morphogenesis under hyphae inducing conditions (Fig. 1). Obtained images revealed that compounds (1, 5, and 6) inhibited morphogenesis in the concentrations ranging from 0.2 \times to 0.4 \times MIC. Compound 7 failed to inhibit the *C. albicans* morphogenesis. Lead compound 6 was further examined for inhibition of the *C. albicans* mature biofilm using the SEM analysis. Compound 6 efficiently inhibited the hyphae formation in biofilm formed by *sap6* Δ and *sap456* Δ strains, however, it failed to inhibit morphogenesis in *wt* biofilm (Fig. 2).

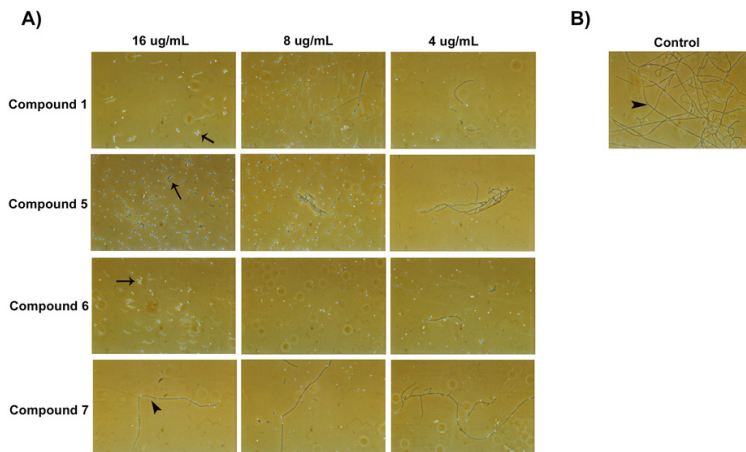


Fig. 1 Inhibition of morphogenesis of *C. albicans* by new sulfanyl and sulfone derivatives. (A) Inhibitory effect of compounds: 1, 5, and 6 on the *C. albicans* hyphae formation, blastoconidial forms were noted (arrow). Under compound 7, long filaments were observed (arrowhead); (B): non-treated control cells grown in RPMI medium (with EtOH at final concentration of 0.09%), abundant hyphae formation was observed (arrowhead).

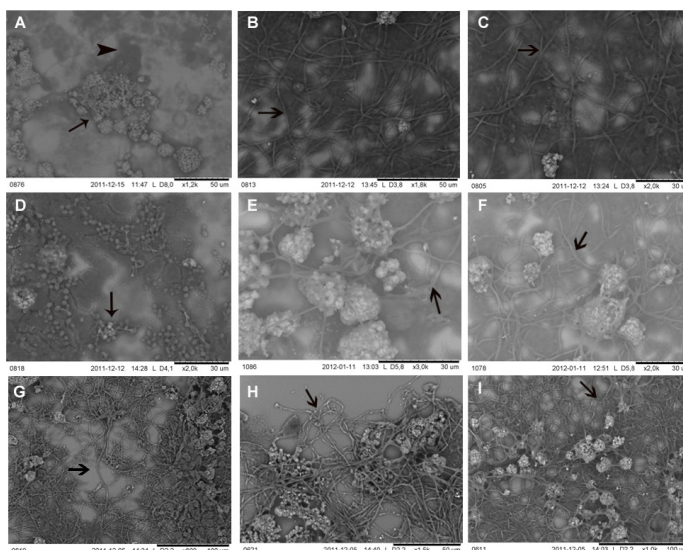


Fig. 2 SEM analysis of sulfone 6 against *C. albicans* mature biofilms. (A) *C. albicans sap6Δ* biofilm treated with 6 at 16 $\mu\text{g/mL}$, blastoconidial cell aggregates (arrow) and residue of Caco-2 (arrowhead) were noted; (B) *C. albicans sap6Δ* biofilm treated with 6 at 8 $\mu\text{g/mL}$, compound failed to inhibit fungal morphogenesis - hyphae (open arrow) were observed; (C) *C. albicans sap6Δ* untreated biofilm (control), abundant hyphal growth (open arrow) was observed; (D) *C. albicans sap456Δ* biofilm treated with 6 at 16 $\mu\text{g/mL}$, highly aggregated blastoconidia (arrow) were seen; (E) *C. albicans sap456Δ* biofilm treated with 6 at 8 $\mu\text{g/mL}$, hyphal growth (open arrow) was observed; (F) *C. albicans sap456Δ* untreated biofilm (control), hyphae (open arrow) were noted; (G) *C. albicans* wild type (*wt*) SC5314 biofilm treated with 6 at 16 $\mu\text{g/mL}$, 6 failed to inhibit fungal morphogenesis, hyphae (open arrow) were observed; (H) SC5314 *wt* biofilm treated with 6 at 8 $\mu\text{g/mL}$ displayed long true-hyphae (open arrow) (I) *C. albicans wt* untreated biofilm (control), abundant hyphal growth (open arrow) was observed.

DISCUSSION

The excessive use of antifungals together with limited therapeutic choices led to the development of antifungal resistance. Therefore, new compounds with different action modes are urgently needed (11). In this context, sulfone moiety constitutes an important core of many therapeutic agents as well as in drug candidates currently being under development (4). The present study was focused on the investigation of a series of new 17 synthesized sulfanyl and sulfone derivatives for their anti-*Candida* activity. Benzothiazole, benzoxazole, nitrobenzene or benzimidazole rings were chosen as scaffolds for the synthesis of sulfur-organic derivatives based on their antifungal potential (6, 17). Many of these derivatives, particularly compounds: 6 and 9 showed good antifungal activity against *C. albicans*. In line with previous studies (6, 17), performed structure-activity analysis revealed that the presence of the electron-withdrawing groups such as $-CF_3$ and/or halogens: $-F$, $-Br$, $-Cl$, and $-I$, generally enhanced the antifungal potential of the tested derivatives. On the contrary to results obtained by Zhao et al. (17), we found that electron-donating groups, such as $-CH_3$ also contribute to increased antifungal potential.

Inhibition of the *C. albicans* virulence factors instead of cell viability represents new promising antifungal strategy (8, 12). Especially the relationship between *SAP* expression and the susceptibility profile of *C. albicans* isolates are of great interest (8). In this study, we used strains with genetic alternations in the genes encoding Sap1-10 isoenzymes to estimate whether these genes are important for the *C. albicans* susceptibility to new sulfone derivatives based on scaffolds such as the following: nitrophenyl, benzothiazole, and benzimidazole. Previously we demonstrated that the halogenomethyl nitrophenyl sulfone's action mode was associated with a reduced virulence arsenal in terms of pathogenic potential related to the expression of the *SAP4-6* genes, adhesion, and the morphogenesis factors. Sulfones were active against the virulence attributes of *C. albicans*, which is unique to antimycotics (14). Current study confirmed that new nitrophenyl sulfone derivatives share this action mechanism. Moreover, derivatives inactive against *C. albicans wt* were effective against the strains attenuated in the hyphae-associated *SAP4-6*, further supporting the role of *SAPs* in the antifungal resistance. Interestingly, we found a clear link between the disruption of *SAP9-10* and the susceptibility profile of *C. albicans* towards benzothiazole sulfones. Sap9 and Sap10 are *C. albicans*' glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored surface-associated proteinases that play a role in maintenance of the cell wall integrity by proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins (1). Hypersensitivity of mutant lacking *SAP9/10* to benzothiazole-based sulfones indicates that these compounds target the fungal cell wall and/or cell membrane components.

The ability of *C. albicans* to form biofilms is a major virulence attribute and a challenge to be managed. The effect of biofilm formation on pathogenicity and their inherent resistance to the majority of known antifungals emphasize the need for the development of new antifungals with efficiency against the biofilm mode of growth (9). Hyphae are required for the stable biofilm formation, which suggests that this cell type has unique role in this process (16). Previously we demonstrated that the use of sulfone derivatives can successfully inhibit degradative enzyme production and the induction of hyphal forms constitutively expressed in the *C. albicans* biofilms difficult to prevent by the current antifungal drugs (14). Following current trends (16) that inhibition of morphological

switch may provide an alternative approach to find compounds with a potential to control the *C. albicans* infections, we found compounds: 1, 5 and 6, inhibiting the morphogenesis process at concentrations below their MICs.

Our findings with the lead compound 6 suggest a general strategy for the antifungal agent development that might be useful in limiting the emergence of resistance in the *Candida* strains. Compound 6 combines the classical antifungal activity (MIC=20 µg/mL) with potent inhibition of the fungal morphogenesis, and it can be considered as the lead structure for further optimization.

Acknowledgements

MS and MG were supported by the project 11/EM 1/2018 founded by the National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene. ZO was supported by Warsaw University of Technology, Faculty of Chemistry.

REFERENCES

1. Albrecht A, Felk A, Pichova I, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 2006; 281: 688-94.
2. Cleary IA, Reinhard SM, Lazzell AL, et al. Examination of the pathogenic potential of *Candida albicans* filamentous cells in an animal model of haematogenously disseminated candidiasis. *FEMS Yeast Res* 2016; 16:fow011. DOI: 10.1093/femsyr/fow011.
3. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition, in: CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, USA, 2008.
4. Feng M, Tang B, Liang SH, Jiang X. Sulfur containing scaffolds in drugs: synthesis and application in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* 2016; 16: 1200-16.
5. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 1984; 198: 179-82.
6. Korzyński MD, Borys KM, Bialek J, Ochal Z. A novel method for the synthesis of aryl trihalomethyl sulfones and their derivatization: the search for new sulfone fungicides. *Tetrahedron Lett* 2014; 55: 745-8.
7. Lermnan U, Morschhäuser J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology* 2008; 154: 3281-95.
8. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4: 119-28.
9. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol* 2015; 69: 71-92.
10. Ochal Z, Kamiński R. Transformations of bromodichloromethyl-4-chlorophenyl sulfone into new compounds with potential pesticidal activity. *Pol J Appl Chem* 2005; 49: 215-25.

11. Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med* 2016; 3:11.
12. Shareck J, Belhumeur P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot Cell* 2011; 10: 1004-12.
13. Staniszewska M, Bondaryk M, Malewski T, Schaller M. The expression of the *Candida albicans* gene *SAP4* during hyphal formation in human serum and in adhesion to monolayer cell culture of colorectal carcinoma Caco-2 (ATCC). *Cent Eur J Biol* 2014; 9: 796-810.
14. Staniszewska M, Bondaryk M, Ochal Z. Susceptibility of *Candida albicans* to new synthetic sulfone derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2015; 348: 132-43.
15. Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopeć E, et al. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz J Microbiol* 2013; 44: 813-21.
16. Vila T, Romo JA, Pierce CG. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence* 2017; 8: 150-8.
17. Zhao S, Zhao L, Zhang X. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of benzothiazole derivatives as antifungal agents. *Eur J Med Chem* 2016; 123: 514-22.

Received: 10 VII 2018

Author Address: 00-791 Warsaw, Chocimska 24, Poland, Department of Sera and Vaccines Evaluation, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, e-mail: mstaniszewska@pzh.gov.pl

Znaczenie normy PN-EN 16615: 2015 w ocenie aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych przeznaczonych do nasączenia chusteczek w obszarze medycznym

Importance of the PN-EN 16615: 2015 standard in the assessment of bactericidal activity of disinfectants intended for soaking wipes in medical area

Agnieszka Chojecka¹, Patryk Tarka², Krzysztof Kanecki², Anita Nitsch-Osuch²

¹Department of Bacteriology and Biocontamination Control; National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland

²Medical University of Warsaw, Department of Social Medicine and Public Health, Warsaw, Poland.

Norma PN-EN 16615: 2015 jest przeznaczona do określenia parametrów działania preparatów dezynfekcyjnych stosowanych do dezynfekcji powierzchni z działaniem mechanicznym. Uwzględnia ona sposób aplikacji preparatu dezynfekcyjnego na powierzchnię gładką, poddawaną dezynfekcji. Zapewnia prawidłowe wyznaczenie parametrów działania preparatów dezynfekcyjnych stosowanych w formie chusteczek, co przyczynia się do przerwania transmisji zakażeń krzyżowych w obszarze medycznym, szczególnie tych przenoszonych przez powierzchnie dotykowe.

Słowa kluczowe: aktywność bakteriobójcza, preparat dezynfekcyjny, chusteczki, powierzchnie dotykowe

ABSTRACT

Introduction: The PN-EN 16615: 2015 standard is intended to determine the acting parameters of disinfectants used for surfaces disinfection with the wiping technique using wipes. It takes into account the application method of disinfectants on the non porous surfaces to be disinfected. The aim of the study was to assess the compliance of the obtained results of control tests with the limit values set in the PN-EN 16615: 2015 standard and to determine the disinfection parameters of the tested product against *Staphylococcus aureus*. **Method:** The disinfectant product tests were carried out using standard wipes described in PN-EN 16615: 2015 standard in four contact times of 1, 5, 10, 15 minutes under clean conditions: 0,3 g / l of bovine albumin solution.

Results: Obtained results of control and validation of the dilution-neutralization method met the criteria of limit values of the PN-EN 16615: 2015 standard. The test product was active against *Staphylococcus aureus* within 15 minutes contact time under clean conditions (reduction > 5,59 lg).

Conclusions: PN-EN 16615: 2015 standard ensures proper determination of acting parameters of disinfectants intended for use in the form of wipes, what contributes to effective disinfection of the surfaces, especially high-touch surfaces, and prevents the occurrence of cross-contamination of other surfaces in the medical area.

Key words: bactericidal activity, disinfectants, wipes, high-touch surfaces

INTRODUCTION

One of the more frequently used surfaces disinfection method is disinfection with mechanical action with using the wiping technique (6, 11). It is made using various types of cleaning tools, of which the wipes are the most widely used. The wipes are supplied by the manufacturers together with the disinfectant or as soaked in a ready-to-use form. Assessment of biocidal activity of this type of disinfectants required the development of new test methods taking into account the method of application of such products to the surface (4, 7, 11, 12, 13).

The PN-EN 16615: 2015 standard is intended for the assessment of bactericidal and yeasticidal effectiveness of disinfectants used for surfaces disinfection with the use of a wiping technique in the medical area (6; 7). With this standard, acting parameters of disinfectants are evaluated under conditions simulating their practical application. Testing of the disinfectant may be carried out using standard wipes described by the standard, supplied by the manufacturer together with a disinfecting preparation or soaked in a ready to use form (7).

The test surface simulates a carrier made of PVC, a material most commonly used in hospitals as a floor covering (1, 7). It is the equivalent of a non porous surface on which the preparation intended for disinfection using the wiping technique is distributed in practice. The test method is referred to as the “4-field test”, as four squares of 25 cm² each are marked on the surface of the carrier, from which the microorganisms are recovered. The suspension of bacteria or *Candida albicans* in an organic interfering substances, is applied to the first test field and fixed to the surface by drying. The action of the disinfection product is checked after wiping the surface of 4 fields with a wipe soaked in the tested product, starting from the first field along the following 3 fields and turning after field 4 to field 1, i.e. returning to the starting point (7). It is a fragment of the semicircle-zigzag movement recommended when performing cleaning and disinfection of surfaces in the medical area (2). This action is aimed at spreading microorganisms along four fields and then return them to the first field. In this way, the parameter of the spread of microorganisms on the surface to be disinfected is assessed. The spreading of microorganisms during the disinfection with mechanical action is observed in the case of disinfecting preparations not showing biocidal efficacy or in the case of cleaning agents. Also size, thickness, composition of materials, layering and degree of absorbency of wipes can influence the capacity of microorganisms spreading on the surfaces (12). The number of microorganisms in individual fields is determined after the contact time of the tested product with the disinfected surface by taking swabs from their surface. The disinfectant can be considered as bactericidal and / or yeasticidal if the reduction of microorganisms on the first field is 5 lg against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa* and 4 lg against *Candida albicans* and the control limits specified in the standard are met (7).

The aim of our research was to introduce the PN-EN 16615: 2015 standard into the scope of laboratory tests within the quality management system by assessing the compliance of the obtained results of control and validation with the limit values set in the standard and determining the disinfection parameters of the tested product against *S. aureus*.

MATERIALS AND METHODS

Test organism: *S. aureus* ATCC 6538 suspension with a density (N) in the range of $1,5 \times 10^9$ cfu/ml do 5×10^9 cfu/ml.

Test surface: PVC carrier with dimensions of 20 cm \times 50 cm with 4 marked squares with sides 5 cm \times 5 cm at a distance of 5 cm from each other (T1-T2 fields). An identical surface was used for control of sterile distilled water with the addition of Polysorbate 80 (Nw).

Surface for recovery control (Dc0 and Dct): PVC carrier with dimensions of 7 cm \times 13 cm with 2 marked squares with sides 5 cm \times 5 cm.

Composition of the test preparation: Ethanol – 500 mg/g; N,N-didecyl-N-methylpoly(oxyethyl)ammonium propionate – 1,1 mg/g.

Standard wipes: 17,5 cm \times 28 cm; composition 55% pulp and 45% polyethylenterephthalat (PET) - Tork Premium Sepzial Tücher, Tork Company.

Granite block: dimensions: 12,1 cm \times 8,6 cm \times 8,6 cm, weight: 2,3 – 2,5 kg; simulates the pressure used when wiping the surface in practical conditions

Neutralizer: Polysorbate 80 – 30 g/l; saponin – 30 g/l; lecithin – 3 g/l in diluent.

Test parameters: product concentration: product ready to use, contact times: 1, 5, 10, 15 minutes, clean conditions: 0,3 g / l of bovine albumin.

Principle of the method: The tests were carried out using the dilution-neutralization method. The wipes were soaked with the test product or in the case of Nw control with the sterile distilled water with the addition of Polysorbate 80. The test surface, the Nw control surface and the recovery control surface (Dc0 and Dct) were infected with the tested suspension of *S. aureus* in the interfering substances solution (final concentration of bovine albumin in suspension – 0,3 g / l), and attached to the surface by drying. The test surface and the Nw control surface were wiped respectively with wipes soaked with the test product and sterile distilled water with the addition of Polysorbate 80, with using standard pressure. After the contact time, *S. aureus* was recovered from the each tested surfaces with moistened cotton swabs. Swab tips were transferred to the neutralizer to abolish action of the test product and to recover *S. aureus* by shaking. After the neutralization time, the growth medium was inoculated with obtained mixture and incubated at 37 °C for 48 hours. In parallel, the same procedure was applied in the case of surfaces intended to recovered *S. aureus* after drying at time $t = 0$ (Dc0) and after tests and the contact times $t = 1, 5, 10, 15$ minutes (Dct). The impact of the test conditions and method verification were determined by performing a neutralizer control (control B - absence of toxicity of neutralizer) and validation of the dilution-neutralization method (method validation C) using the validation suspension of *S. aureus* (Nv0) (7).

Calculations: The bactericidal activity of the product in the tested contact times was determined based on the reduction in the T1 field (R_{T1}). R_{T1} is the difference calculated from the number of microorganisms recovered from the surface for recovery control after the tested contact times (Dct) and the number of microorganisms remaining on the surface after the action of the test product (7). The reduction R_{T1} was expressed in a decimal logarithmic scale (lg). The results are the mean of three replications.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to assess the conformity of the obtained results of control and validation with the assumptions of the standard PN-EN 16615: 2015, *S. aureus* was selected as one of the 3 test organisms required to determine the bactericidal effect of disinfecting preparations intended to soaking wipes. *S. aureus* is often used in studies of the bactericidal effectiveness of disinfectants as a model organism for Gram-positive bacteria (5, 6). It is characterized by good survival on non-living surfaces in a hospital environment. In the case of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), the survival range on surfaces until to 7 days and to more than 7 months (3). The survival of *S. aureus* in adverse environmental conditions is important in studies of the biocidal effectiveness of disinfectants because most often the microorganisms are attached to the surface of the carriers by drying at 37 °C (7, 11). In the conducted research, *S. aureus* recovery from carriers intended for drying control (Dc0 and Dct), after the drying process at time $t = 0$ and after each of the tested contact times ($t = 1, 5, 10, 15$ minutes) was consistent with the assumptions of the PN-EN 16615: 2015 standard. There was also no effect of the test conditions on *S. aureus* recovery after testing with sterile distilled water with Polysorbate 80 (Nw) and the effect of the toxicity of the used neutralizer (B) on the tested validation suspension (Nv0). The validation of the dilution-neutralization method (C) showed that the used neutralizer abolished the residual action of the tested disinfectant and ensured the correct determination of contact times selected for the study (Table I).

Table I. Control parameters of the dilution-neutralization method and results obtained with the selected *S. aureus* ATCC 6538 test organism at the tested contact times (1, 5, 10, 15 minutes) according to PN-EN 16615: 2015-06.

Control Parameters	Unit	Contact times (min)				Basic limits
		1	5	10	15	
Nv0	cfu/ml	131	121	121	107	from 30 to 160
B	cfu/ml	127	115	115	107	$\geq 0,5 \times Nv0$
C	cfu/ml	121	125	125	118	$\geq 0,5 \times Nv0$
N0	lg	8,25	8,26	8,26	8,27	$7,88 \leq \lg \leq 8,40$
Dc0	lg	7,23	7,37	7,36	7,40	$6,88 \leq \lg \leq 8,40$
Dct	lg	7,24	7,32	7,37	7,44	$6,88 \leq \lg \leq 8,40$
Mean Nw _(T2-T4)	cfu/25 cm ²	>15767	2283	>13133	1450	>10

Nv0 - validation suspension, B - toxicity control of the neutralizer, C - validation of the dilution-neutralization method, N0 - density of the *S. aureus* suspension at time $t = 0$; Dc0 - recovery control after drying at time $t = 0$; Dct - recovery control after the contact time $t = 1, 5, 10, 15$ minutes; Nw (T2-T4) - the average number of *S. aureus* on the fields from T2 to T4.

The test disinfectant intended for soaking the wipes did not show bactericidal activity against *S. aureus* at contact times of 1, 5 and 10 minutes under clean conditions. The bactericidal effect of the wipes was found during 15 minutes contact time, in which the reduction achieved was in accordance with the requirements of PN-EN 16615: 2015 and amounted $> 5,59$ lg. Wipes soaked with the tested disinfectant did not meet the requirements of European Standards determined for the disinfection of high-touch surfaces, where the activity of the disinfectant on the surface should be achieved during contact times from 1 to 5 minutes (7, 8, 9). However, they met the require-

ments according to the National Institute of Public Health - National Institute of Hygiene methods, in which the contact time for surfaces disinfection can not be longer than 15 minutes (10). Wipes soaked with disinfectant are products most frequently used for surfaces often touched by patients and medical personnel such as bed rails, door handles or bedside tables, computer keyboard (13). For this reason, it is important that they action was in short contact times. The bactericidal activity of disinfectants used for this type of surfaces is also an important factor preventing the spread of bacteria and cross-infection in the medical area (3, 13). In the case of wipes soaked with the tested disinfectant, there was no *S. aureus* spread on the used carriers. The number of bacteria in the T2 to T4 fields ranged from 0 to 5 cfu/25 cm² and met the requirements of the standard in each of the contact times studied (Table II).

Table II. Reduction of *S. aureus* ATCC 6538 obtained in the T1 field and the average number of colony forming units in the T2 to T4 fields.

Parameters	Unit	Contact times (min)				Basic limits
		1	5	10	15	
Reduction test field 1 (R_{T1})	lg	3,08	3,73	4,79	>5,59	$R \geq 5$
Mean T2-T4	cfu/25 cm ²	0	0	0	5	≤ 50

The amount of product released on the test surface during the wiping was similar in all tested contact times and had no effect on its bactericidal activity. The largest amount of product was released to the surface in the test with 5 minutes contact time, in which the required reduction against *S. aureus* was not achieved. The amount of sterile distilled water with the addition of Polysorbate 80 released to the surface at the same pressure was lower than the product tested and ranged from 1.3 g to 1.6 g. The amount of water released on the surfaces ensured the correct distribution of *S. aureus* in the T2 to T4 fields (Table I and III).

Table III. Mean mass of product and of the sterile distilled water with Polysorbate 80 (Nw) released to the surface of the carrier.

Parameters	Unit	Contact times (min)			
		1	5	10	15
Mass of product	g	2,0	2,4	2,2	2,1
Mass of Nw	g	1,3	1,4	1,5	1,6

CONCLUSIONS

1. The results obtained against *S. aureus* in the control tests met the limit values criteria set in the PN-EN 16615: 2015 standard.
2. Wipes soaked with the tested disinfectant achieved the required reduction against *S. aureus* during 15 minutes contact time, under clean conditions.
3. PN-EN 16615: 2015 standard allows for proper determination of acting parameters of disinfecting products intended for soaked of wipes in conditions simulating their practical application, what contributes to the effective disinfection especially of high-touch surface, and prevents the spread of cross-contamination in the medical area.

REFERENCES

1. *Dulny G, Lejbrandt E, Tymoczko A.* Higiena w placówkach opieki medycznej. Cześć 5. Metody sprzątanía. Rozdział 3. Elementy materiałoznawstwa. Wydawnictwo Verlag Dashöfer 2014.
2. *Dulny G, Lejbrandt E, Tymoczko A.* Higiena w placówkach opieki medycznej. Cześć 5. Metody sprzątanía. Rozdział 6. Metody sprzątanía. Wydawnictwo Verlag Dashöfer 2014.
3. *Fleischer M, Rusiecka-Ziołkowska J, Jermakow K, Fleischer-Stępniewska K.* Dekontaminacja środowiska szpitalnego i jej znaczenie w profilaktyce zakażeń związanych z hospitalizacją. *Forum Zakażeń* 2015; 6: 217-25.
4. *Gebel, J., Exner, M., French, G. et al.* The role of surface disinfection in infection prevention. *GMS Hyg Infect Control* 2013; 8: 1-12.
5. *Lopez GU, Kitajima M, Havas A, Gerba ChP, Reynolds KA.* Evaluation of a disinfectant wipe intervention on fomite-to-finger microbial transfer. *App Environ Microbiol* 2014; 80: 3113-8.
6. PN-EN 14885: 2015-10. Chemical disinfectants and antiseptics. Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics.
7. PN-EN 16615: 2015-06. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal activity on non-porous surfaces with mechanical action employing wipes in the medical area (4-field test) – Test method and requirements (phase 2, step 2).
8. PN-EN 13727: 2012+A2. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in medical area – Test method and requirements (phase 2; step 1).
9. PN-EN 13624: 2013-12. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in medical area – Test method and requirements (phase 2; step 1).
10. PZH DF 01/03: 2003.07.02 Metoda określanía stężeń użytkowych preparatów dezynfekcyjnych. Metoda nośnikowa. Warszawa 2003; 1-16.
11. *Sattar SA, Bardley C, Kibbee R i inni.* Disinfectant wipes are appropriate to control microbial bioburden from surface: use of new ASTM standard test protocol to demonstrate efficiency. *J Hosp Infect* 2015; 91: 319-25.
12. *Sattar SA, Maillard JY.* The crucial role of wiping in decontamination of high-touch environmental surfaces: Review of current status and directions for the future. *Amer J Infect Control* 2013; 41: 97-104.
13. *Williams GJ, Denyer SP, Hosein IK, Hill DW, Maillard JY.* The development of a new three-step protocol to determine the efficacy of disinfectant wipes on surfaces contaminated with *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2007; 67: 329-5.

Received: 3 VIII 2018 r.

Author's Address: 00-791 Warsaw, Chocimska 24, Department of Bacteriology and Biocontamination Control; National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland

Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń wywołanych przez *Listeria monocytogenes*

Microbiological diagnosis of infections caused by *Listeria monocytogenes*

Natalia Rokosz-Chudziak, Waldemar Rastawicki, Karolina Śmietańska

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Palczki *Listeria monocytogenes* to Gram-dodatnie bakterie, szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym (gleba, woda, ścieki, rośliny i warzywa, produkty spożywcze), wywołujące u człowieka chorobę zwaną listeriozą. Listerioza objawia się najczęściej w postaci bakteremii, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, zakażeń okołoporodowych a także nieżytu żołądkowo-jelitowego. W pracy przedstawiono metody mikrobiologicznej diagnostyki zakażeń wywołanych przez palczki *Listeria monocytogenes* u ludzi.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, diagnostyka mikrobiologiczna, listerioza

ABSTRACT

Listeria monocytogenes are Gram-positive, relatively anaerobic bacteria, widely distributed in the natural environment (soil, water, sewage, plants and vegetables, food products), causing a disease called listeriosis in humans. Listeriosis is manifested most often in the form of bacteremia, meningitis and encephalitis, perinatal infections as well as gastroenteritis. Currently, it is perceived as a contemporary threat to human life and health. This review discusses the microbiology diagnosis of infections caused by *Listeria monocytogenes* in humans.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, microbiology diagnosis, listeriosis

WSTĘP

Drobnoustroje znane obecnie jako *Listeria monocytogenes* po raz pierwszy wyizolowano w 1924 roku od chorujących na posocznicę królików i świnek morskich. Dwa lata później Murray opisał te Gram-dodatnie palczki jako *Bacterium monocytogenes*, a dopiero w 1940 roku Harvey Pirie zmienił nazwę rodzaju na *Listeria* (3, 4, 9). Do 1961 roku

L. monocytogenes była jedynym przedstawicielem rodzaju *Listeria* sp. W następnych latach włączono do rodzaju *Listeria* kolejnych kilkanaście gatunków, w tym między innymi: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimer*, *L. seeligeri* i *L. ivanovii* (9, 14).

Pałeczki *L. monocytogenes* są etiologicznym czynnikiem listeriozy, choroby przenoszącej się głównie drogą pokarmową, stanowiącej istotny problem zdrowia publicznego w wielu krajach (1, 2, 5, 9). Częste zanieczyszczenie produktów pochodzenia zwierzęcego pałeczkami *Listeria* wymusza konieczność kontroli żywności pod kątem obecności tych drobnoustrojów (1, 2, 4, 5, 9).

Najważniejszą cechą chorobotwórczych gatunków *Listeria* jest zdolność do namnażania się zarówno w środowisku zewnętrznym jak i w organizmach żywych. Istotny jest też problem bezobjawowego nosicielstwa, najczęściej w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Szacuje się, że u ludzi zjawisko to dotyczy około 5-10% populacji (2, 9). Jak wynika z najnowszych danych European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), wskaźnik zachorowalności na listeriozę w krajach Unii Europejskiej i krajach stowarzyszonych (EEA/EFTA) w 2015 roku wynosił 0,5 na 100.000 mieszkańców (2). Niestety, choroba ta charakteryzuje się znaczną śmiertelnością (20-30%) i wysokim odsetkiem hospitalizacji (97,4%) (2, 9). W Polsce, w 2017 roku odnotowano 123 przypadki listeriozy, z czego aż 120 (97,6%) osób było hospitalizowanych. Zapadalność na listeriozę w naszym kraju w 2017 roku wyniosła 0,32 na 100.000 mieszkańców (19).

Chorobotwórczość pałeczek *L. monocytogenes* związana jest z występowaniem u tych patogenów szeregu czynników zjadliwości, między innymi takich jak:

1. internalina (InI) – jest to białko powierzchniowe ułatwiające adhezję i wnikanie bakterii do komórek eukariotycznych,
2. białko powierzchniowe ActA - białko zlokalizowane na jednym z końców pałeczki, indukujące w cytoplazmie komórki gospodarza polimeryzację aktyny; wytworzony tzw. ogon aktynowy, określany jako „kometa listeryjna”, umożliwia komórce przemieszczanie się i rozprzestrzenianie między komórkami,
3. listeriolizyna O (LLO) – jest to egzotoksyna odpowiedzialna za przerywanie błon fagolizosomów,
4. egzoenzymy: fosfolipazy w tym fosfolipaza C (PLC), umożliwiająca zakażenie kolejnych komórek bez groźby zniszczenia przez komórki układu immunologicznego gospodarza (3, 6, 13, 17).

Do klinicznych postaci listeriozy u ludzi mogących mieć bardzo poważne następstwa zalicza się bakteremię, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu oraz zakażenia okołoporodowe. Okołoporodowa listerioza noworodków może przebiegać formę o wczesnym lub późnym początku. Wcześniejsza jest wynikiem wewnątrzmacicznego zakażenia i objawia się na ogół jako sepsa. Późniejsza postać, nabywana w trakcie lub tuż po porodzie, rozwija się w drugim lub trzecim tygodniu życia dziecka, w większości przypadków jako zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (3, 9, 15). Listerioza może też być przyczyną poronień. Poza wymienionymi powyżej postaciami klinicznymi pałeczki *L. monocytogenes* mogą wywołać zapalenie żołądka i jelit, zapalenie wsierdza, zapalenie otrzewnej, zapalenie oraz ropień wątroby, infekcje skórne oraz infekcje mięśniowo-szkieletowe (3, 6, 7, 9, 17, 13). Ze względu na przebieg choroby możemy wyróżnić następujące postaci listeriozy: ostrą, podostrą, przewlekłą z nawrotami lub poronną (3).

Pierwsze objawy u osób dorosłych po zakażeniu drogą pokarmową występują po upływie 24-48 godzin od spożycia skażonej żywności. Mogą wystąpić wówczas niecharaktery-

styczne objawy, takie jak: ból stawów, ból głowy, umiarkowana biegunka, gorączka, inne objawy żołądkowe czy senność. Najczęściej objawy samoistnie ustępują, czasami jednak listerioza może mieć ciężki przebieg, zwłaszcza o osób z grup ryzyka, takich jak noworodki, osoby starsze, kobiety w ciąży czy pacjenci o upośledzonej odporności (7, 13).

W 2018 roku na potrzeby nadzoru epidemiologicznego przyjęto następującą definicję listeriozy (19):

Kryteria kliniczne:

Każda osoba, która spełnia co najmniej jedno z następujących trzech kryteriów:

Listerioza noworodków - definiowana jako urodzenie martwe lub co najmniej jedno z następujących pięciu kryteriów w ciągu pierwszego miesiąca życia:

- ziarniniakowatość (granulomatosis infantiseptica),
- zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych lub zapalenie opon i mózgu,
- posocznica,
- duszność,
- zmiany skórne, błon śluzowych lub spojówek,

Listerioza u kobiet w ciąży - definiowana jako jedno z następujących trzech kryteriów:

- poronienie, przedwczesne zakończenie ciąży, urodzenie martwe lub poród przedwczesny,
- gorączka,
- objawy grypopodobne,

Inne postaci listeriozy - definiowane jako jedno z następujących czterech kryteriów:

- gorączka,
- zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych lub zapalenie opon i mózgu,
- posocznica,
- zakażenia miejscowe, takie jak zapalenie stawu, zapalenie wsierdza oraz ropnie.

Kryteria laboratoryjne

Co najmniej jedno z następujących dwóch kryteriów:

- izolacja *Listeria monocytogenes* z miejsca, które w warunkach prawidłowych jest jałowe,
- izolacja *Listeria monocytogenes* z miejsca, które w warunkach prawidłowych nie jest jałowe u płodu, płodu martwo urodzonego, niemowlęcia lub matki w ciągu 24 godzin od porodu.

Kryteria epidemiologiczne

Co najmniej jedno z następujących trzech powiązań epidemiologicznych:

- narażenie przez to samo źródło,
- przeniesienie z człowieka na człowieka (zakażenie wertykalne),
- narażenie przez skażoną żywność/ wodę pitną.

Informacje dodatkowe; okres inkubacji: od 3 do 70 dni, najczęściej 21 dni.

Klasyfikacja przypadku:

A. Przypadek możliwy- nie dotyczy.

B. Przypadek prawdopodobny: każda osoba spełniająca kryteria kliniczne i epidemiologiczne.

C. Przypadek potwierdzony: każda osoba spełniająca kryteria laboratoryjne lub każda matka, w wypadku której zakażenie płodu, dziecka martwo urodzonego lub niemowlęcia zostało potwierdzone laboratoryjnie.

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

Rozpoznanie listeriozy stawiane jest na podstawie wywiadu lekarskiego, obrazu klinicznego oraz wyników badań laboratoryjnych. Ze względu jednak na znaczne zróżnicowanie objawów klinicznych, podstawą rozpoznania są wyniki badań hodowlanych, genetycznych lub znacznie rzadziej serologicznych (4).

Material kliniczny do badań

Rodzaj próbek materiału klinicznego do badań mikrobiologicznych, w których poszukuje się pałeczek *Listeria*, zależy od diagnozowanej postaci listeriozy. W postaci nieokoloprodowej (zapalenie centralnego układu nerwowego, posocznica) pałeczki *Listeria* izoluje się z materiałów klinicznych takich jak: krew, płyn mózgowo-rdzeniowy czy biopaty z narządów wewnętrznych (4, 13, 17) W przypadku zatrucia pokarmowego materiałem do badań mikrobiologicznych jest kał (13, 18). U dzieci z podejrzeniem infekcji wrodzonej powinno się wykonać zaraz po urodzeniu posiew smółki, moczu bądź aspiratu z żołądka. W przypadku wczesnej listeriozy noworodków bada się wody płodowe, smółkę, krew dziecka i matki, materiał z pochwy i macicy. Pomocne może być także wykonanie preparatu bezpośredniego z wymazu z gardła i worka spojówkowego noworodka, a także ze smółki, z ropy ze zmian na skórze oraz z osadu uzyskanego po odwirowaniu płynu mózgowo-rdzeniowego (16, 17).

Badania mikroskopowe

Preparat barwiony metodą Grama. Bakterie z rodzaju *Listeria* to Gram-dodatnie, krótkie pałeczki o długości 1,2 μm i szerokości 0,5 μm , które zazwyczaj występują pojedynczo lub tworzą krótkie łańcuszki. Mogą też organizować się w skupiska palisadowe i przyjmować kształt litery V i Y (14). W preparatach z materiałów klinicznych często są widoczne wewnątrz komórki, układając się parami, mogą przypominać pneumokoki (16). W preparacie z płynu mózgowo-rdzeniowego zabarwionym metodą Grama bakterie nie są wykrywalne z powodu bardzo małej liczby ($<10^4$) (18).

Preparat przyżyciowy z hodowli. Istnieje możliwość obserwacji w mikroskopie świetlnym wirowego ruchu postępowego pałeczek *Listeria* w preparacie przyżyciowym w kropli 0,85% NaCl. Do wykonania tego preparatu używa się 18-24 godzinnej hodowli pałeczek *Listeria* w temp. 37°C na podłożu Columbia Agar z krwią baranią (18).

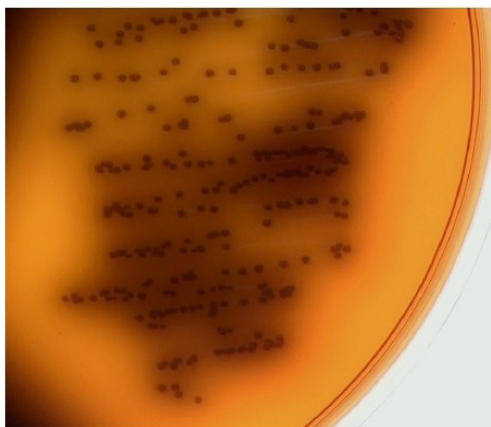
Hodowla

Pałeczki *Listeria* można hodować w warunkach tlenowych lub bez obecności tlenu. Lepiej namnażają się w atmosferze uzupełnionej 5-10% CO₂. Rosną dobrze na zwykłych podłożach, chociaż w przypadku próbek materiału klinicznego zawierających dużą liczbę drobnoustrojów towarzyszących zaleca się stosowanie podłoży wybiórczych i przechowywanie próbek przed wykonaniem posiewu w niskich temperaturach (w lodówce). Pałeczki *Listeria* nie wymagają do wzrostu pożywek wzbogaconych, ale ze względów praktycznych hoduje się je na agarze z krwią, na którym można zaobserwować wąski rąbek hemolizy typu β wokół drobnych (1-1,5 mm) kolonii *L. monocytogenes*. Do pożywek z krwią nie powinno się używać agaru tryptozowo-sojowego (TSA), ponieważ zawarta w nim celobioza powoduje represję genu hemolizyny. Krwinki powinny być przepłukane fizjologicznym roztworem soli, gdyż w organizmach zwierząt od których są pobierane, często występują

przeciwiała hamujące wzrost pałeczek *Listeria*. Na pożywkach bez krwi kolonie są szaroniebieskawe, a w świetle przechodzącym niebiesko-zielone (4, 16, 18).

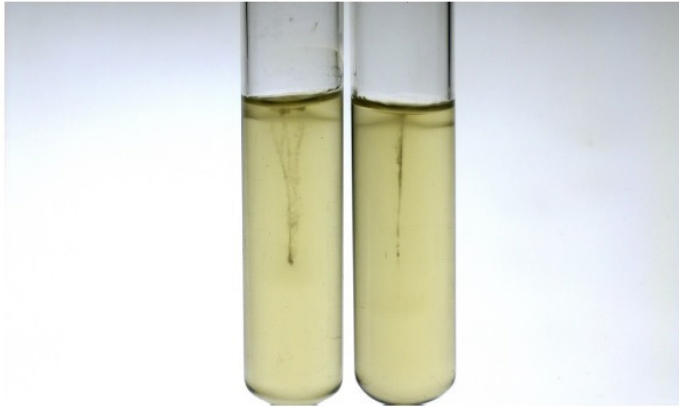
Pałeczki *Listeria* mogą się namnażać w szerokim zakresie wartości pH (pH 6-9) i szerokim zakresie temperatur (1-45°C). Tę ostatnią cechę wykorzystuje się w diagnostyce listeriozy. Materiał kliniczny, zmieszany w proporcji 1:10 z bulionem, umieszcza się w temperaturze 4°C. Pałeczki *Listeria* mnożą się w niskich temperaturach w przeciwieństwie do innych drobnoustrojów izolowanych z organizmu człowieka. Co kilka dni zakłada się subkultury na agarze z krwią lub pożywkach selektywnych zawierających antybiotyki, najczęściej kolistynę i kwas nalidyksowy (Agar CNA, bulion LE (ang. *Listeria* enrichment broth), podłoże według Van Nettena). Podłoża te, a także pożywki z substratami chromogennymi, są też używane do bezpośredniego posiewu próbek klinicznych (4, 16, 18).

Do izolacji stosuje się stałe podłoże diagnostyczno-wybiórcze PALCAM Agar według *Van Nettena* (4, 11, 18). Czynniki selektywnymi w tym podłożu są antybiotyki polimyksyna B i cefazydym, barwnik akrylawina oraz chlorek litu, natomiast czynnikiem różnicującym jest m.in. eskulina (18). Hodowle można inkubować w warunkach tlenowych lub w atmosferze wzbogaconej w CO₂, przez 48 godzin w temperaturze 35°C. Kolonie pałeczek *Listeria* na podłożu PALCAM są małe, połyskujące, szarzielone, o równym brzegu. Charakterystyczną, morfologiczną cechą kolonii *L. monocytogenes* jest czarne zabarwienie środka oraz wyraźne czarne halo wokół niej. Zaczernienie powstaje w wyniku hydrolizy eskuliny - cechy charakterystycznej dla wszystkich pałeczek *Listeria* (Fot. 1) (4, 16, 17, 18). W celu oceny udziału bakterii β-hemolizujących we florze kolonizującej układ pokarmowy u chorych leczonych antybiotykami oraz pacjentów oddziałów intensywnej terapii próbki kału lub wymazu posiewane są dodatkowo na podłoże agarowe z krwią. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 37°C przez 24 - 48 godzin (4, 16).

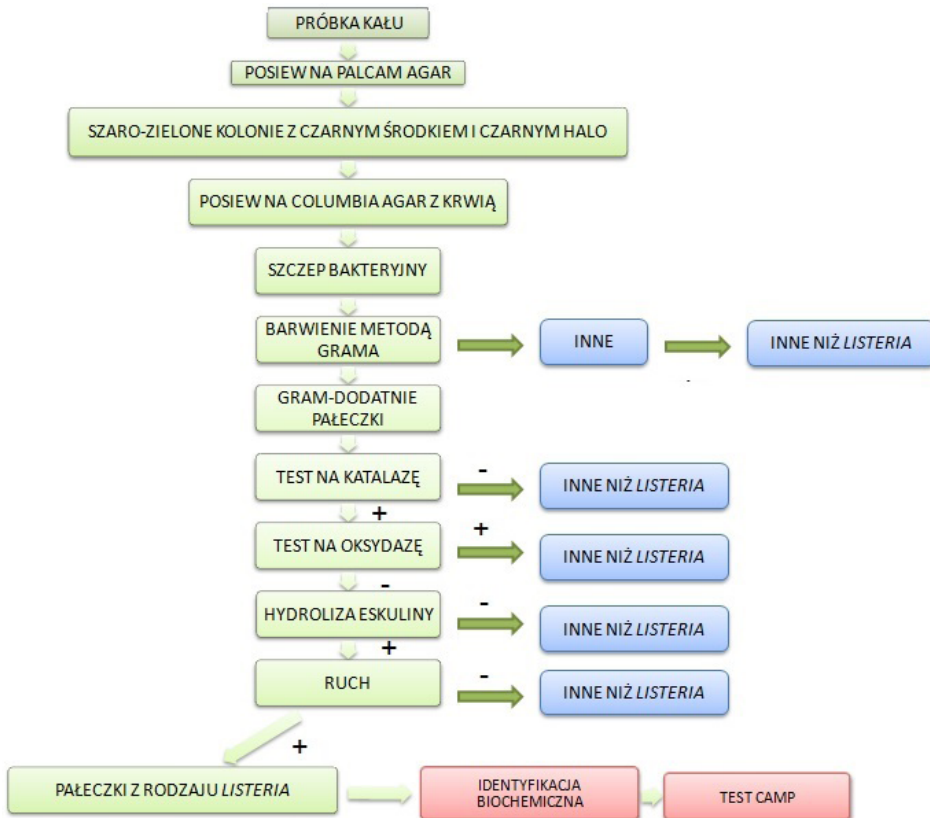


Fot. 1. Wzrost pałeczek *Listeria monocytogenes* na podłożu PALCAM (18).

Posiew podpowierzchniowy, czyli tzw. posiew kłuty, *L. monocytogenes* na podłoże półpłynne (0,2 - 0,4% agar z peptonem), umożliwia po 24 - 48 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej (optimum 25°C), wykazanie charakterystycznego dla pałeczek *Listeria* ruchu w kształcie „parasola” (Fot.2). W temperaturze 37°C większość szczepów *L. monocytogenes* jest nieruchliwa (4, 17). Schemat posiewu próbki kału i identyfikacji wybranych gatunków pałeczek *Listeria* przedstawia Rycina 1 (18).

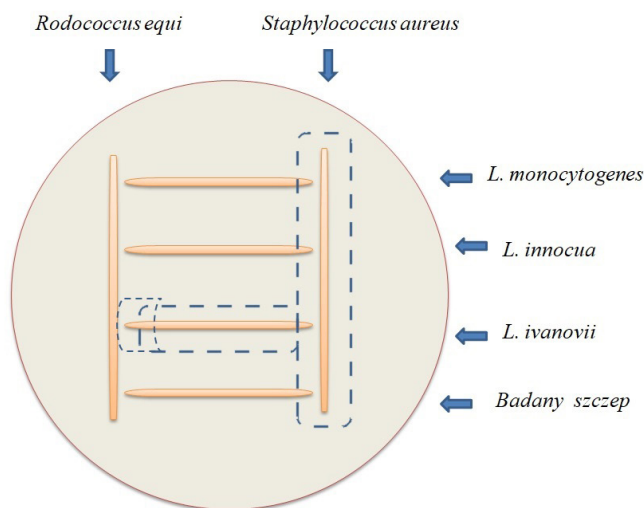


Fot. 2. Wynik testu na ruchliwość pałeczek *Listeria monocytogenes* (18).



Ryc. 1. Schemat posiewu próbki kału w kierunku pałeczek *Listeria* (18).

W celu potwierdzenia identyfikacji pałeczek *L. monocytogenes* wykonuje się test CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) polegający na wykrywaniu wzmocnienia hemolizy szczepów *L. monocytogenes* lub *L. ivanovii* przez β -hemolityczny wywołanej przez szczep *Staphylococcus aureus* oraz szczep *Rhodococcus equi*. W celu wykonania testu posiewa się pionowymi liniami β -hemolityczny szczep *S. aureus* oraz szczep *R. equi* na podłoże Columbia Agar z 5% dodatkiem krwi baraniej. Poprzecznie do nich, w odległości 2-3 mm (między liniami posiewu), posiewa się badane szczepy pałeczek *Listeria*. Wzmocnienie hemolizy od strony *S. aureus* i brak wzmocnienia dla *R. equi* jest cechą charakterystyczną dla *L. monocytogenes*. Silne wzmocnienie hemolizy od strony *R. equi* (w postaci kapelusza grzyba) jest potwierdzeniem, iż szczepem jest *L. ivanovii*. Natomiast *L. innocua* nie daje wzmocnienia hemolizy z obydwoma szczepami wzorcowymi. Schemat wykonania oznaczenia i interpretacji testu CAMP przedstawia Rycina 2 (4, 18).



Ryc. 2. Schemat wykonania i interpretacji testu CAMP (8)

Identyfikacja biochemiczna

Właściwości biochemiczne najczęściej izolowanych od człowieka pałeczek *Listeria* oznacza się podstawowymi testami na aktywność katalazy, aktywność oksydazy, hydrolizę eskuliny, fermentację D-ksylozy, fermentację L-ramnozy, fermentację D-rybozy i hydrolizę hipuranu (4, 12, 18). Obecnie dostępne są dwa typy szybkich testów wykorzystujących profil biochemiczny badanych drobnoustrojów do identyfikacji pałeczek *Listeria* – automatyczne w systemie VIDAS (bioMerieux) i manualne. Różnią się one odmiennym sposobem odczytu wyniku reakcji. W systemie VIDAS zmiana reakcji barwnej odczytywana jest przez urządzenie natomiast w systemie manualnym przez osobę wykonującą test. W Polsce jako pierwsze na rynku pojawiły się testy manualne z serii API firmy bioMerieux. Obecnie dostępne są też testy Microbact *Listeria* 12L (Oxoid) oraz Microgen *Listeria* ID MID-67c (Microgen Bioproducts) (11).

Systemy automatyczne do identyfikacji

Próbki materiału klinicznego naturalnie jałowe (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy) można badać w kierunku obecności *Listeria monocytogenes* z wykorzystaniem systemów automatycznych, np. BACT/Alert, BD Bactec, MicroScan (Baxter Healthcare Corporation), Vitek (bioMerieux), MicroStation (Biolog, Heyward) and Cobas (Becton Dickinson Instrument Systems) (11, 16, 17).

Diagnostyka serologiczna zakażenia *Listeria monocytogenes*

Według Światowej Organizacji Zdrowia badania serologiczne mające na celu oznaczenie poziomu przeciwciał anti-*L. monocytogenes* nie mają większego znaczenia diagnostycznego w rozpoznaniu listeriozy, aczkolwiek w przypadku wczesnej listeriozy wykrycie przeciwciał w surowicy krwi matki i dziecka daje możliwość szybkiej diagnozy (4, 16, 17).

Do wykrywania przeciwciał dla listeriolizyny O wykorzystuje się test pośredni ELISA. Jednakże ze względu na antygenowe pokrewieństwo listeriolizyny O ze streptolizyną *Streptococcus pyogenes*, pneumolizyną *S. pneumoniae* czy perfringolizyną *Clostridium perfringens*, swoistość testu jest niska (5). W niektórych laboratoriach (m.in. w Laboratorium Zakładu Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych NIZP-PZH w Warszawie) stosowany jest odczyn mikroaglutynacji jako test wykrywający w surowicy krwi przeciwciała swoiste dla antygenów pałeczek *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*.

W badaniach serologicznych wykorzystuje się również odczyn immunofluorescencji z płynem mózgowo-rdzeniowym czy odczyn wiązania dopełniacza z surowicą krwi. Bardzo czuła jest metoda immunohistochemiczna wykorzystywana do wykrywania antygenów *L. monocytogenes* w utrwalonych formaliną preparatach pobranych z układu nerwowego (4, 5).

Typowanie serologiczne

Szczepy *L. monocytogenes* różnią się między sobą determinantami antygenowymi znajdującymi się na powierzchni komórki. Izolaty rozpoznane biochemicznie mogą podlegać dalszej identyfikacji serologicznej klasyczną metodą serotypowania opierającą się na wykorzystaniu metody aglutynacji szkiełkowej do identyfikacji antygenów somatycznych oraz aglutynacji próbówkowej do identyfikacji antygenów rzęskowych (4, 10). Serotyp determinowany jest odpowiednią kombinacją ciepło-stabilnego antygeny somatycznego O oraz ciepło-labilnego antygeny rzęskowego H (1, 4, 14). Wśród szczepów *L. monocytogenes* wyróżniono 13 serotypów: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4ab i 7. Ze wszystkich serotypów dla człowieka najbardziej niebezpieczne uważane są 1/2a, 1/2b i 4b, którym przypisuje się 95% przypadków listeriozy u ludzi, z czego serotyp 4b jest odpowiedzialny za 50% zachorowań na listeriozę na świecie (1, 4, 9, 10, 14).

Metody biologii molekularnej

W diagnostyce listeriozy zastosowanie znalazła również metoda PCR, a także typowanie metodami molekularnymi, które jest bardzo ważne podczas dochodzenia epidemiologicznego. Przy użyciu gatunkowo-specyficznego PCR możliwa jest identyfikacja bakterii do poziomu gatunku. Istnieje również możliwość użycia sond genetycznych wykrywających w badanym materiale geny sterujące syntezą białka p60, a także fragmenty sekwencji nukleotydowych genu kodującego listeriolizynę hlyA i genu kodującego białko regulatorowe dla tej toksyny prfA. Stosuje się również techniki umożliwiające wykrycie fragmentów wielu genów (multiplex PCR) (1, 4, 10, 16, 18).

Dostępne genetyczne metody subtypowania pozwalają na poznanie elementów genomiki, epidemiologii oraz ekologii pałeczek *L. monocytogenes*. Stosowanie technik molekularnych pozwala na szybsze i skuteczniejsze wykrywanie i opracowywanie epidemicznych ognisk wywoływanych przez zakażenie pałeczkami tego gatunku (1, 4, 8). Opisanych jest przynajmniej kilka metod genotypowania pałeczek z rodzaju *Listeria*, wśród których najczęściej wymienia się: analizę makrorestrykcyjną genomowego DNA z zastosowaniem elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (REA- PFGE), rybotypowanie, metody bazujące na technice łańcuchowej reakcji polimerazy, jak również metody MLVA (*Multiple-Locus Variable-number tandem-repeats Analysis*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*) wraz z ich odmianami. Metoda MLST polega na porównaniu wysoce stabilnych sekwencji alleli wybranych genów typu „housekeeping” – kodujących białka biorące udział w podstawowym metabolizmie, warunkującym przeżycie komórki. Technika MLVA opiera się na analizie tandemowych powtórzeń, znajdujących się w DNA. Wykorzystywana jest głównie w celu ustalenia filogenetycznego pochodzenia badanych szczepów (4,8).

Analiza polimorfizmu długości restrykcyjnych fragmentów chromosomalnego DNA w zmiennym polu elektrycznym (REA-PFGE) stosowana jest w toku dochodzenia epidemiologicznego w przypadku zakażeń pałeczkami *Listeria monocytogenes*. Jest ona bardzo przydatna zarówno w odniesieniu do szczepów pochodzących z ognisk epidemicznych wywołanych przez pałeczki *Listeria monocytogenes* jak i sporadycznych przypadków listeriozy (8).

W celu szybkiego porównania pokrewieństwa szczepów wykorzystuje się inne metody genotypowania, oparte na technice łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Najważniejsze metody w odniesieniu do szczepów pałeczek *Listeria monocytogenes* to: metody Multiplex PCR, AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism* - polimorfizm długości fragmentów amplifikowanych), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction* - łańcuchowa reakcja polimerazy- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) oraz metody z grupy RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA), wśród których do najpowszechniej stosowanych zaliczane są: RAPD-PCR, AP-PCR, rep-PCR oraz ERIC-PCR (4, 8).

PODSUMOWANIE

Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń pałeczkami *Listeria monocytogenes* obejmuje przede wszystkim metody izolacji i identyfikacji bakterii z próbek materiału klinicznego. Stosowanie metod biologii molekularnej pozwala na szybkie i skuteczniejsze wykrywanie i opracowywanie epidemicznych ognisk wywoływanych przez zakażenie pałeczkami *Listeria*. Metody serologiczne nie mają większego znaczenia diagnostycznego w rozpoznaniu listeriozy.

PIŚMIENNICTWO

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Fifth external quality assessment scheme for *Listeria monocytogenes* typing. Sztokholm: ECDC; 2018.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Sztokholm: ECDC; 2018.

3. Galińska E, Knap J, Stoczyńska-Sikorska M. Listerioza – mało znana, niebezpieczna choroba zakaźna. *Medycyna Ogólna* 2010; 16(XLV), 4.
4. Gasanov U, Hughes D, Hansbro P. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29: 851-75.
5. Gliński Z, Kostro K. Listerioza współczesnym zagrożeniem. *Życie Weterynaryjne* 2012; 87: (7).
6. Heczko i wsp. *Mikrobiologia lekarska*. PWZL, 2016, s.123-24.
7. Kołakowska A, Madajczak G. Pałeczki *Listeria monocytogenes* w zakażeniach ludzi. *Przeegl Epidemiol* 2011; 65: 57-62.
8. Kołakowska A, Madajczak G. Genetyczne metody typowania pałeczek *Listeria monocytogenes*. *Przeegl Epidemiol* 2011; 65: 421 – 7.
9. Lewańska M, Godela A, Myga-Nowak M. Listerioza - współczesne postrzeganie zagrożenia epidemiologicznego. *Post Mikrobiol*, 2018; 57: 106-16.
10. Madajczak G, Majczyna D. Serologiczne typowanie i genoserotypowanie pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z próbek materiału klinicznego, próbek żywności i próbek środowiskowych. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 79 - 85
11. Madajczak G, Szych J, Wojcik B, Mąka Ł, Formińska K. Validation of direct plating of a stool sample as a method for *Listeria monocytogenes* detection. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 69-74.
12. Madajczak G. Porównanie testów do identyfikacji biochemicznej pałeczek *Listeria* sp. *Diagnosta laboratoryjny* nr 1 (30), 2013: 25-8.
13. Murray P., Rosenthal K., Pfaller M, Red. *Przondo-Mordarska A*. *Mikrobiologia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011, wyd.1, 249-52.
14. Muskalska K, Szymczak B. Postępy badań nad bakteriami rodzaju *Listeria*. *Post Mikrobiol*, 2015; 52: 123-32.
15. Rekomendacje postępowania w zakażeniach bakteryjnych ośrodkowego układu nerwowego. Rekomendacje diagnostyczno-terapeutyczno-profilaktyczne. Narodowy Instytut Leków, Warszawa, 2011.
16. Szewczyk E. *Diagnostyka bakteriologiczna*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2013, s. 70-73, 348-349.
17. Szkaradkiewicz A. *Mikrobiologia lekarska. Repetytorium z bakteriologii*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Poznań 2011, 42-43.
18. Szych J, Madajczak G. Zakażenia i zatrucia wywołane przez bakterie rosnące w warunkach tlenowych. W: Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruc pokarmowych. Red. Jagielski M. Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2010, 92-101.
19. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH. Definicje przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego stosowane w 2018 roku. Warszawa 2018, wersja 4, grudzień 2017, s. 40

Otrzymano: 1 X 2018 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Charakterystyka i oporność na wybrane środki dezynfekujące
przetrwaliików laseczek *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*

Characteristics and resistance to selected disinfectants of bacterial
spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*.

Anna Kinga Kierzkowska

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia
Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Pomimo pojawiania się na rynku coraz to nowszych preparatów dezynfekcyjnych wciąż nie ma preparatów biobójczych, które skutecznie likwidowałyby spory wielolekoopornych patogennych bakterii. Z tego powodu, większość dostępnych na rynku preparatów sporobójczych stanowią mieszanki kilku substancji. W pracy omówiono charakterystykę endospor laseczek *Bacillus*, cykl ich rozwoju oraz wykaz obecnie skutecznych substancji stosowanych w mieszaninach preparatów sporobójczych.

Słowa kluczowe: przetrwalniki, sporulacja, dekontaminacja, dezynfekcja, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*

ABSTRACT

Despite the emergence of newer disinfectant preparations on the market, there are still no biocides that would effectively eliminate spores of multi-drug resistant pathogenic bacteria. For this reason, most commercially available sporicidal preparations are mixtures of several substances. The paper discusses the endospore characteristics, their development cycle and the list of currently effective substances used in mixtures of sporicidal preparations

Keywords: endospores, sporulation, decontamination, disinfection, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*

WSTĘP

Stosowanie środków dezynfekujących stanowi jedną z podstawowych metod zwalczania szkodliwych mikroorganizmów. Środki te często jednak są nieskuteczne wobec bakterii wytwarzających spory, między innymi laseczek *Bacillus subtilis*, i *Bacillus cereus*,

które dzięki dużej łatwości rozprzestrzeniania się w środowisku mogą stwarzać zagrożenie dla bezpieczeństwa człowieka.

W odpowiedzi na działanie środków biobójczych i bakteriobójczych mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów obronnych w wyniku których są mniej wrażliwe na działanie substancji zawartych w preparatach dezynfekujących. Wciąż trwają badania w celu stworzenia skutecznych preparatów sporobójczych.

W prezentowanej pracy omówiono budowę i oporność na wybrane środki dezynfekujące bakteryjnych przetrwalników laseczek *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*.

CHARAKTERYSTYKA PAŁECZEK *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS*

Bacillus cereus to laseczki Gram-dodatnie, tlenowe lub beztlenowe, wytwarzające ciepłoodporne formy przetrwalnikowe. Do grupy *B. cereus* zalicza się sześć gatunków, które charakteryzują się podobieństwem fenotypowym oraz genotypowym. Według badań takie gatunki jak *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* cechuje ponad 99% podobieństwo pod względem sekwencji 16S rRNA i dotyczy 9 nukleotydów (1). Bakterie *Bacillus cereus* wstępują głównie w żywności i produktach spożywczych wywołując zakażenia pokarmowe, ale także w glebie, wodach, powietrzu oraz materiale roślinnym i organizmach zwierząt i ludzi. W środowisku występuje najczęściej w formie wegetatywnej i przetrwalnikowej wytwarzając spory ciepłoodporne. W formie wegetatywnej jest aktywna metabolicznie i w dogodnych warunkach środowiska intensywnie się namnaża tworząc kolejne kolonie bakterii.

Produkty w których odnotowano najczęstsze występowanie tych bakterii to: makarony, ryż, płatki a także mięso, mleko, sosy. Jeżeli zostaną spożyte pokarmy zakażone przetrwalnikami laseczek *B. cereus*, które nie zostały zniszczone w namnażającym się pokarmie, prowadzi do syntezy enterotoksyny w obrębie jelita. Zakażenie tego typu objawia się uporczywą, wodnistą biegunką. Zanieczyszczone sporami *Bacillus cereus* mogą być także suszone produkty mleczne, w tym produkty dla niemowląt.

Chorobotwórczość *B. cereus* wynika z produkcji enterotoksyn oraz toksycznych enzymów. Laseczki *B. cereus* produkują β -laktamazy odpowiedzialne za oporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe. Enterotoksyny wytwarzane przez laseczki *Bacillus* to przede wszystkim różne typy hemolizyn: cereolizyna, sfingomielinaza, cereolizyna AB, hemolizyna II, hemolizyna BL, hemolizyna III oraz trzy typy fosfolipazy C, toksyna emetyczna i dwa kompleksy enterotoksyn, które wywołują silne wymioty (2). Za formę biegunkową zatrucia odpowiada enterotoksyna z grupy hemolizyn typu BL, HBL. W temperaturze pokojowej komórki bakteryjne wytwarzają enterotoksynę i toksynę emetyczną, która jest oporna na ponowne podgrzewanie pokarmu.

Inwazyjność *B. cereus* związana jest z zewnętrznymi strukturami tych bakterii, ich hydrofobowością i hydrofilnością a także zdolnością do adhezji i namnażania się w organizmie człowieka. Hydrofobowa powierzchnia spor ułatwia im przytwierdzenie się do ścian jelit. Przytwierdzone spory kielkują w środowisku jelita cienkiego tworząc formy wegetatywne a następnie wytwarzając enterotoksynę w miejscu docelowym. Szczepy *B. cereus* poza błoną cytoplazmatyczną i ścianą komórkową posiadają w swojej strukturze warstwę powierzchniową „S” produkowaną przez formy wegetatywne bakterii. Według badaczy, warstwa „S” odpowiada za hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych

i jest potrzebna dla efektywnej adhezji komórek bakteryjnych wobec ludzkich białek strukturalnych (1).

Do zakażenia zazwyczaj dochodzi po spożyciu ugotowanych pokarmów zbożowych zanieczyszczonych przetrwalnikiem laseczek (opornych na gotowanie) i pozostawionych w temperaturze pokojowej.

B. cereus oprócz zatrucia pokarmowego może powodować wiele innych schorzeń u osób z obniżoną odpornością. Są to zarówno zakażenia ran przypadkowych i pooperacyjnych, jak i znacznie częściej, zakażenia oczu: zapalenie rogówki, wewnętrzne zapalenie oka, zapalenie całej gałki ocznej (1).

Bacillus subtilis to Gram-dodatnie laseczki, tlenowe lub względnie beztlenowe, katalazododatnie. Ruchliwe, urzęsione perytrychalnie lub biegunowo. Występują w glebie, wodach słodkich i słonych rozkładając związki organiczne pochodzenia roślinnego ale mogą także występować w żywności. Naturalnie występuje w organizmie człowieka będąc składnikiem flory jelitowej pełniąc rolę w rozwoju tkanki limfatycznej układu pokarmowego. Wykazują zdolność do przetrwania w trudnych warunkach środowiska, w tym dużych wahań temperatur, pH i zasolenia.

Bacillus subtilis charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem pod względem budowy fizjologicznej i metabolizmu wynikającej z różnorodności genetycznej. Zawartość G + C w chromosomalnym DNA waha się od 32 do 69%.

Wyróżnia się trzy typy rozwojowe *Bacillus subtilis*. Pierwsza to forma wegetatywna, w której bakterie mają dostęp do substancji odżywczych i dzielą się symetrycznie, druga to forma przetrwalnikowa oraz trzecia forma tzw. kiełkowanie. *Bacillus subtilis* wykazuje zdolność do wytwarzania antybiotyków polipeptydowych i enzymów zewnątrzkomórkowych m.in. hydrolaz depolimeryzujących substancje wielocząsteczkowe, toksyn oraz innych metabolitów (1).

PRZETRWALNIKI BAKTERYJNE

Przetrwalniki bakteryjne to spoczynkowa forma bakterii, potocznie nazywana „fazą metaboliczną” lub w „fazą śmierci pozornej”. Endospory skrajnie odporne zwane są formami w stanie „głębokiej, super uśpionej, anabiozy” (13). Bakterie w tej fazie wykazują wysoką zdolność adaptacyjną do przetrwania w bardzo trudnych warunkach środowiska - fizycznych oraz chemicznych - przeżywając przez wiele miesięcy a nawet lat. *Bacillus* nabyły tę cechę na drodze ewolucji i uwarunkowań genetycznych (14). Stały się one ogromnym problemem w procesie dezynfekcji powierzchni, materiałów poddawanych dekontaminacji oraz przemyśle spożywczym odpowiadając za zatrucia przemysłowe.

Bakterie tworzą endospory w procesie zwanym sporulacją, w wyniku niedostatku składników pokarmowych, suszy, nieodpowiedniej temperatury oraz nagromadzenia się produktów przemiany materii (9). Endospory nie wykazują zdolności do rozmnażania się, a każda komórka bakteryjna tworzy w swoim wnętrzu tylko jeden przetrwalnik. Charakteryzuje je odmienna struktura morfologiczna i biochemiczna w porównaniu do wegetatywnej formy komórki bakteryjnej, która w dogodnych warunkach wytwarza toksyny i enzymy odpowiedzialne za ich chorobotwórczość. Do kiełkowania przetrwalników (germinacji) niezbędne są induktory takie jak woda, składniki odżywcze: cukry, nukleotydy oraz aminokwasy m. i. L-alanina, która dzięki aktywności racemazy alaninowej jest

przekształcana w D-alanine. Tak więc, sporulacja jest procesem odwracalnym ponieważ komórka bakteryjna może ponownie po sporulacji przejść w fazę wegetatywną jeśli zaistnieją sprzyjające warunki (13,14).

BUDOWA I PRZEŻYWALNOŚĆ PRZETRWAŁNIKÓW BAKTERYJNYCH LASECZEK *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS*

Pojedynczy przetrwalnik zbudowany jest z płaszczu zewnętrznego i wewnętrznego chroniącego przed czynnikami chemicznymi oraz kory, która odpowiada za oporność na wysoką temperaturę. Przetwalnik może mieć kształt kulisty lub owalny oraz być umieszczony w różny sposób: centralnie, biegunowo lub podbiegunowo (10,11). Powstaje w momencie zaistnienia warunków stresowych w wyniku których dochodzi do zahamowania podziału i wzrostu komórki. Proces sporulacji uaktywnia system złożonych białek wysyłających sygnał z wnętrza komórki. Jest to sześć białek regulatorowych, określanych jako czynnik „sigma (σ)”.

Białka regulatorowe regulowane są przez czynnik transkrypcyjny – białko „Spo0A,, ulegające fosforylacji i zmieniające około 500 genów. Odpowiada ono za kształt przyszłego przetrwalnika (18).

W pierwszym etapie rozwoju powstaje prespora oraz sporangium przedzielone przegrodą. Następnie zagęszcza się cytoplazma a prespora oddziela się od sporangium na skutek wytwarzania się kolejnych osłon: błony, ściany komórkowej, rdzenia i kory tworząc płaszcz osłonowy. Rdzeń zawiera materiał genetyczny, w 10-20% osłonięty małymi białkami tzw. SASP (*small acid-soluble spore protein*), które chronią przed światłem ultrafioletowym. Białka te nie występują w komórce wegetatywnej (3, 9). Kora zbudowana jest z peptydoglikanu, który odpowiada za utrzymanie właściwego ciśnienia wewnątrzkomórkowego. Płaszcz osłonowy zbudowany jest z dwóch warstw – wewnętrznej, składającej się z dwóch cienkich blaszek oraz zewnętrznej jednorodnej warstwy, składającej się w 70% z białek oraz enzymów degradujących i inaktywujących toksyczne, niebezpieczne związki nadając tym odporności na czynniki środowiskowe (9,13).

Dojrzewanie przetrwalnika wymaga 24 godzin, a następnie minimum 6 godzin aby nabrał oporności na wysoką temperaturę. Po zakończeniu tej fazy ustępuje metabolizm a komórka bakteryjna, w której wnętrzu powstał przetrwalnik ulega rozpadowi (8). Dojrzały przetrwalnik przechodzi w stan spoczynku - anabiozy tzw. „pauzy metabolicznej” (14). Czynnikiem warunkującym to przejście jest utrata wody w rdzeniu do 28-57% (w komórce wegetatywnej jest jej ponad 75%) oraz wytworzenie się wysokiego poziomu enzymu pirydyny – 2 i kwasu dipikolinowego (DPA). Ograniczają tym ruch makrocząsteczek przyczyniając się do spoczynku spor (17). Jeżeli w trakcie zachodzenia procesu sporulacji nagle pojawią się korzystne warunki środowiskowe, komórka nie może wznowić procesu wzrostu. Zdolność wzrostu odzyskuje po uzyskaniu pełnej dojrzałości (17).

Przetwalniki bakteryjne są odporne na wysoką temperaturę. Przeżywają w temperaturze 100°C od kilku do kilkudziesięciu godzin. *B. subtilis* może rosnąć w temperaturze 60-70°C dlatego jest laseczką termotolerancyjną (8). Zarodniki *B. cereus* przeżywają w temperaturze 95°C przez 45 minut, natomiast w 100°C w czasie 2,2-5,4 min zachodzi redukcja decymalna (17). Wraz ze wzrostem temperatury spada przeżywalność spor. W temperaturze 112°C przeżywalność spor wynosi średnio 30 min ale dla każdego gatunku warunki inaktywacji są inne i specyficzne. Oporność przetrwalników na wysoką temperaturę wynika z obecności

w strukturach komórkowych kwasu dipikolinowego z jonami wapnia DPA-Ca⁺ (DPA – dipicolinic acid), który wpływa regulująco na proces kiełkowania spor oraz inne enzymy, które zachowują strukturę spor w temperaturze powyżej 100°C. Rozpad cząsteczek tego kwasu powoduje osłabienie struktur komórkowych form wegetatywnych bakterii.

Udowodniono, że wywoływanie szoku termicznego (obniżanie i podwyższanie temperatur) od 70°C do 100°C w czasie od 5 minut do 60 minut może powodować uszkodzenie struktur zewnętrznych płaszcza osłonowego przetrwalników.

OPORNOŚĆ PRZETRWALNIKÓW *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS* NA ŚRODKI DEZYNFEKUJĄCE

Preparaty biobójcze i antyseptyczne służą ograniczeniu rozprzestrzeniania się mikroorganizmów w sektorze medycznym, spożywczym i przemysłowym pełniąc ogromną rolę w kontroli zakażeń. Jednak większość z nich działa na formy wegetatywne bakterii nie radząc sobie z formami przetrwalnikowymi (17,16).

W dezynfekcji wyróżnia się trzy poziomy w zależności od wymaganej klasy czystości: poziom niski, w którym niszczy się wegetatywne formy bakterii oraz niektóre wirusy, poziom średni, inaktywujący mykobakterie i wirusy oraz poziom wysoki, w którym dezynfekcja jest najskuteczniejsza wobec przetrwalników, grzybów i wirusów (18).

Skuteczność dezynfekcji zależy od zastosowanego stężenia roztworu, czasu kontaktu oraz czynników zewnętrznych, takich jak: temperatura, ciśnienie i pH. Skuteczny dezynfektant powinien być aktywny wobec mikroorganizmów oraz odporny na niekorzystne warunki środowiska (np. nie powodować korozji), być bezpieczny dla człowieka (nie powodować uczuleń lub być hypoalergiczny), być stabilny w wodzie twardej, dobrze się rozpuszczać, nie powodować przebarwień powierzchni, ulegać biodegradowalności. Dezynfektanty o szerokim spektrum działania zawierają w swoim składzie: kwas nadoctowy, fenole, alkohole czwartorzędowe, związki amoniowe, detergenty, chlorowce, związki kompleksujące związki organiczne rtęci, które są bardzo toksyczne względem form wegetatywnych bakterii ale nie działają na spory. Niespełna tylko kilka grup związków działa sporobójczo. (15). Związki występujące w środkach sporobójczych podzielone są na dwie grupy. Do pierwszej grupy należą: związki utleniające (np. nadtlenek wodoru), kwas nadoctowy oraz nadsiarazan potasu. Natomiast do drugiej grupy należą aldehydy, takie jak np. aldehyd glutarowy, uważany za skuteczny i najczęściej wykorzystywany (15,16).

Gotowe środki dezynfekujące są zazwyczaj mieszaniną różnych związków ponieważ za skuteczny uważa się preparat, który zawiera w swoim składzie kilka substancji (15,16). FDA (Food and Drug Administration) prowadzi wykaz dopuszczalnych i stosowanych środków dezynfekcyjnych wysokiego stopnia. Obecnie na rynku dopuszczone są do sprzedaży preparaty, które zawierają w swoim składzie: $\geq 2,4\%$ aldehyd glutarowy, $0,55\%$ aldehyd ortoftalowy (OPA), $0,95\%$ aldehyd glutarowy z $1,64\%$ fenolem/fenolanem, 75% nadtlenek wodoru z $0,23\%$ kwasem nadoctowym, 1% nadtlenek wodoru z $0,08$ kwasu nadoctowego oraz $7,5\%$ nadtlenu wodoru. Preparaty te mają bardzo dobre działanie sporobójcze (12).

Środki dezynfekujące są wciąż testowane wobec bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe. Dotychczasowe badania są przeprowadzane najczęściej wobec bakterii z rodzaju *Bacillus*.

Środkiem dezynfekującym aktywnym wobec przetrwalnikujących bakterii *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* jest między innymi aldehyd glutarowy. Środek ten jest najczęściej stosowany do sterylizacji narzędzi i innych materiałów, które nie mogą być wyjaławia-

ne z zastosowaniem wysokich temperatur. Jest skuteczny wobec bakterii wytwarzających spory ponieważ tworzy mocne wiązania krzyżowe z grupami aminowymi ściany komórkowej i płaszczu osłonowego. Wodne roztwory aldehydu glutarowego nie wykazują działania sporobójczego lecz wykazują działanie dezynfekujące. Dopiero jeżeli roztwór zostanie aktywowany i przekształcony w alkaliczny przez zastosowanie czynników alkalizujących do pH 7,5-8,5, wtedy nabiera właściwości sporobójczych.

Badania przeprowadzone z aldehydem glutarowym wykazały, że 5% roztwór działa sporobójczo na spory *Bacillus* (18). Według innych badaczy, 2% roztwór glutaraldehydu redukuje spory *B. cereus* o 4 rzędy liczby logarytmicznej w czasie 15-20 minut, natomiast spory *B. subtilis* tylko 1 log w czasie 30 minut (19). Udowodniono, że 1,5% glutaraldehyd w środowisku z zanieczyszczeniami organicznymi redukuje liczbę spor w czasie wydłużonym do 8 godzin (18). Mechanizm działania aldehydu glutarowego nie jest jeszcze dobrze poznany. Z badań naukowych wiadomo że niszczy warstwę białek SASP osłaniających płaszcz a następnie uszkadza strukturę DNA (18).

Kolejnym silnym dezynfektantem jest nadtlenek wodoru. Stosowany był już od lat 70-tych i jest stosowany nadal jako dodatkowa substancja w mieszaninach preparatów sporobójczych. Nadtlenek wodoru działa na bakterie przez tworzenie destrukcyjnych wolnych rodników hydroksylowych, które atakują błony lipidowe i DNA (12). Nadtlenek wodoru wykazuje działanie sporobójcze wobec bakterii *B. subtilis* oraz *B. cereus*. W stężeniu 30% niszczy całkowicie spory w ciągu 30 minut. Inne wyniki badań wykazały zmniejszenie spor w czasie 5 minut o jeden rząd jednostek, natomiast po 60 minutach następną redukcję ich ilości o kolejną liczbę logarytmiczną. Wydłużenie czasu działania do 180 minut pozwala na całkowitą redukcję spor. Nadtlenek wodoru, którego stężenie zostało obniżone do 26% zredukował liczbę spor *Bacillus subtilis* o 4 log. w czasie 11 minut.

Trzecim najczęściej używanym dezynfektantem jest kwas nadoctowy, który charakteryzuje się szybkim działaniem wobec drobnoustrojów. Usuwa zanieczyszczenie organiczne, nie pozostawia biofilmów i działa sporobójczo nawet przy niskich temperaturach. Niestety jest roztworem niestabilnym. Jako roztwór 1% po 6 dniach traci już połowę swojej aktywności. Natomiast roztwór 40% traci 1-2% swojej aktywności w ciągu miesiąca. Przeprowadzone badania wykazały, że kwas nadoctowy w stężeniu 0,05-1% zabija spory w 15 sekund do 30 minut (12).

PODSUMOWANIE

Badania naukowe poświęcone skuteczności preparatów sporobójczych wykazują, że najskuteczniejsze środki to mieszaniny zawierające aldehyd glutarowy. Redukuje on liczbę spor w czasie od 15 minut do 8 godzin w zależności od zastosowanego stężenia i drobnoustroju na który działa. Szeroko przeprowadzane badania naukowe poświęcane zwalczaniu bakterii wielolekoopornych skupiają duże zainteresowanie ponieważ bakterie te wciąż stwarzają wiele problemów podczas przeprowadzania skutecznej dezynfekcji.

PIŚMIENNICTWO

1. Bednarczyk A, Kozon-Daczkowska E. Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. Postępy Mikrobiologii 2008; 47: 51-63.

2. Bartoszewicz M, Czyżewska U. Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe *Bacillus cereus* Sensu Lato. Postępy Mikrobiologii 2017; 56: 440-50.
3. Dudkiewicz B, Kmieciak W, Kraszewska A i inni. Ćwiczenia z mikrobiologii dla studentów analityki pod red. Eligii M. Szewczyk. Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej. Uniwersytet Medyczny w Łodzi 2014.
4. Garbusińska A. Przetrwalniki bakteryjne w procesie dekontaminacji. Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie. Dział Centralnej Sterylizacji. Gliwice.
5. Granum PE, Anderson A, Gayther C, Lund T, Larsen H. Evidence for a further enterotoxin complex producent by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiology Letters 1996; 141:145-149 <https://pdfs.semanticscholar.org/6c20/471e5421d47bbf503d2577b5f30cb0ca4b5d.pdf>
6. Imamura D, Watabe K. Spore and sporulation. Research Signpost 2012; 261-82.
7. Imamura D, Watabe K. Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. JB Accepts, published online ahead of print on 10 June 2011.
8. Kozajda A, Stańczyk-Szadłowska I. Bakterie *Bacillus subtilis* jako problem legislacyjny higieny pracy w Polsce. Medycyna Pracy 2012; 63: 91-6.
9. Książczyk M, Krzyżewska E, Futoma-Kołoch B i inni. Oddziaływanie związków dezynfekcyjnych na komórki bakteryjne w kontekście bezpieczeństwa higieny i zdrowia publicznego. Postępy Hig Med Dos (online) 2015; 69:1042-55.
10. Leclerc H, Gaillard JL, Simonet. La spore Bacterinne. Microbiologie generale 1998
11. Obuchowski M, Hinc K. Przetrwalniki *Bacillus subtilis* – nośniki jadalnych szczepionek. Laboratorium przemysłowe 2011; 7:39-41
12. Ochojska-Joško J, Spandel L. Zakażenia *Clostridium difficile* jako problem zdrowia publicznego. Problemy Higieny i Epidemiologii 2014;95: 568-73.
13. Olesiak P, Stępnik L. Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych wobec przetrwalników *Bacillus*. Inżynieria i Ochrona Środowiska 2012; 15: 41-50.
14. Olesiak P, Smyła A, Krupa P, Kostecki M. Aktywność wybranych dezynfektantów wobec przetrwalników bakterii z rodzaju *Bacillus*. Archives of Environmental Protection 2012; 38: 63-73.
15. Parnowska W. Znaczenie stosowania i badań skuteczności środków dezynfekcyjnych w profilaktyce zakażeń szpitalnych. Postępy Nauk Medycznych 2000; 3: 54-60.
16. Staniszewska M, Rohm-Rodowald E, Jakimiak B. Działanie sporobójcze środków dezynfekcyjnych. Zakażenia 2006; 12: 14-7.
17. Szuliński D. Współczesne techniki zamrażania. Odporność drobnoustrojów na niskie temperatury i jej wpływ na jakość produktów mrożonych. Wydział Mechaniczny 2009;1-8
18. Tennen R, Setlow B, Davils KL. Mechanisms of killiling of spores of *Bacillus subtilis* by iodine glutaraldehyde and nitrous acid. Journal of Microbiology 2001; 89: 330-8.
19. William A. Rutala, David J. Weber. Wytyczne do dezynfekcji i sterylizacji w zakładach opieki zdrowotnej 2008; 59-63

Otrzymano: 11 X 2018 r.

Adres Autora: 00-721 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Czynn timerów Zakaźnych

Charakterystyka humoralnej odpowiedzi w poszczególnych podklasach IgG w przebiegu wybranych zakażeń bakteryjnych u ludzi

Characteristics of humoral response in individual IgG subclasses in the course of selected bacterial infections in humans

Waldemar Rastawicki

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Przeciwciała podklas IgG1-IgG4 stanowią około 70-75% całkowitej puli wszystkich immunoglobulin człowieka. Wykazano, że w przebiegu zakażeń bakteryjnych antygeny białkowe stymulują wytwarzanie głównie przeciwciał podklasy IgG1 a w mniejszym stopniu IgG3, IgG4 i IgG2, natomiast antygeny polisacharydowe przede wszystkim przeciwciał podklasy IgG2 oraz znacznie słabiej IgG1. U dzieci charakterystyczne jest niskie powinowactwo przeciwciał podklasy IgG1 do antygenów węglowodanowych, jednak w miarę dojrzewania układu immunologicznego przeciwciała te zastępowane są przez przeciwciała podklasy IgG2 o wyższym powinowactwie. Przedłużona ekspozycja na antygeny może prowadzić do wzrostu stężenia w surowicy chorego przeciwciał podklasy IgG4.

Słowa kluczowe: przeciwciała, podklasy IgG1, IgG2, IG3, IG4, odpowiedź humoralna, zakażenia bakteryjne

ABSTRACT

It has been recognized that human serum IgG is composed of four distinct subclasses. The IgG subclasses differ not only in their distribution in normal serum, but also in their biological properties and the nature of the antigens which elicit their production. In general, bacterial proteins antigens preferentially induce IgG1 antibodies in humans, with minor contributions of IgG3 and IgG4. In contrast, IgG response to polysaccharides is normally restricted to the IgG2 subclass, although some polysaccharides also induce substantial amounts of IgG1.

Key words: antibodies, subclasses IgG1, IgG2, IG3, IG4, humoral response, bacterial infections

WSTĘP

Przeciwciała klasy IgG stanowią około 70-75% całkowitej puli wszystkich immunoglobulin człowieka. Immunoglobuliny te składają się z dwóch łańcuchów lekkich i dwóch identycznych ciężkich łańcuchów polipeptydowych połączonych wiązaniem dwusiarczkowym. Na podstawie typu łańcucha ciężkiego klasę IgG podzielono na 4 podklasy (IgG1-IgG4). Występują one odpowiednio w następujących proporcjach: IgG1 – 66%, IgG2-23%, IgG3 - 7%, IgG4 - 4% (11, 27). Stężenie przeciwciał należących do poszczególnych podklas IgG zależy od wieku osoby badanej. Poziom przeciwciał otrzymanych od matki obniża się po urodzeniu i osiąga minimum w 3-6 miesiącu życia. W największym stopniu przechodzą przez łożysko przeciwciała podklasy IgG1 i IgG3, w najmniejszym zaś przeciwciała podklasy IgG2. Synteza każdej podklasy jest regulowana niezależnie. Stężenie przeciwciał podklasy IgG1 i IgG3 występujące u osób dorosłych osiągane jest już w młodym wieku, natomiast stężenie przeciwciał podklasy IgG2 i IgG4 znacznie później (1, 6, 11).

Wykazano, że bakteryjne antygeny białkowe stymulują wytwarzanie głównie przeciwciał podklasy IgG1 a w mniejszym stopniu IgG3, IgG4 i IgG2 natomiast antygeny polisacharydowe przede wszystkim przeciwciała podklasy IgG2 oraz znacznie słabiej IgG1. U dzieci charakterystyczne jest niskie powinowactwo przeciwciał podklasy IgG1 do antygenów węglowodanowych, jednak w miarę dojrzewania układu immunologicznego przeciwciała te zastępowane są przez IgG2 o wyższym powinowactwie. Przedłużona ekspozycja na antygeny może prowadzić do wzrostu stężenia w surowicy chorego przeciwciał podklasy IgG4 (6, 7, 11). Wybrane właściwości przeciwciał należących do poszczególnych podklas IgG przedstawiono w tabelach I-II.

Tabela I. Synteza przeciwciał podklas IgG u dzieci w zależności od wieku.

Przeciwciała podklasy IgG1 i IgG3	Poziom w stosunku do stężenia immunoglobulin u osób dorosłych
1 rok życia dziecka	50%
5 rok życia dziecka	75%
Przeciwciała podklasy IgG2 i IgG4	Poziom w stosunku do stężenia immunoglobulin u osób dorosłych
1 rok życia dziecka	20%
5 rok życia dziecka	50%
14 rok życia dziecka	70%

Dotychczasowa analiza humoralnej odpowiedzi w przebiegu zakażeń bakteryjnych u ludzi w większości przypadków ogranicza się głównie do poszukiwania swoistych przeciwciał w klasie immunoglobulin A, G i M. W dostępnej literaturze istnieją jedynie nieliczne doniesienia na temat badania przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG swoistych dla zakażeń bakteryjnych.

Celem pracy jest zaprezentowanie, na podstawie badań własnych oraz danych piśmiennictwa, charakterystyki odpowiedzi immunologicznej w poszczególnych podklasach IgG w przebiegu wybranych zakażeń bakteryjnych u ludzi.

Tabela II. Wybrane własności fizykochemiczne i biologiczne przeciwciał należących do poszczególnych podklas IgG.

Właściwości	Typ immunoglobulin			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Średnie stężenie w surowicy	9 mg/ml	3 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml
Okres półtrwania (dni)	21	20	7	21
Masa cząsteczkowa ($\times 10^3$)	146	146	170	146
Wartościowość	2	2	2	1
Wiązanie dopełniacza	++	+	+++	-
Przechodzenie przez łożysko	++	+	++	++

WYSTĘPOWANIE PRZECIWCIAŁ W POSZCZEGÓLNYCH PODKLASACH IgG W PRZEBIEGU WYBRANYCH ZAKAŻEŃ BAKTERYJNYCH

Jersinioza. W serodiagnostyce zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Yersinia enterocolitica* oraz *Yersinia pseudotuberculosis* wykorzystywane są zarówno antygeny białkowe, głównie białka wydzielnicze Yop, jak i antygeny lipopolisacharydowe (LPS) uzyskiwane z pałeczek należących do poszczególnych grup serologicznych. Przeprowadzone w NIZP-PZH badania wykazały, że zgodnie z oczekiwaniem, bakteryjne antygeny białkowe stymulują wytwarzanie głównie przeciwciał podklasy IgG1 a w mniejszym stopniu IgG3, IgG2 i IgG4 (IgG1>IgG3>IgG2>IgG4), natomiast antygeny polisacharydowe przede wszystkim przeciwciał podklasy IgG2 oraz znacznie słabiej IgG1 i IgG3 (IgG2>IgG1>IgG3). Nie wykryto obecności przeciwciał podklasy IgG4 dla antygenów LPS (15). Ciekawych obserwacji dostarczyła analiza wyników w zależności od wieku badanych osób oraz płci. U dzieci w wieku do dwóch lat, zarówno dla LPS jak i antygenów białek wydzielniczych, zdecydowanie dominują przeciwciała podklasy IgG1 i IgG3. Wraz z wiekiem badanych osób wykazano natomiast konsekwentny spadek poziomu przeciwciał podklasy IgG3 dla LPS oraz wzrost poziomu przeciwciał podklasy IgG2 dla antygenów białkowych i LPS. Co więcej, przeciwciała podklasy IgG4 stwierdzano statystycznie częściej u pacjentów płci męskiej niż żeńskiej (15).

Krztusiec. Badania serologiczne prowadzone odczynem ELISA wykorzystywane są często w rutynowej diagnostyce krztuśca. W tym przypadku najczęściej poszukuje się przeciwciał dla toksyny krztuścowej oraz włóknikowej hemaglutyniny pałeczek *B. pertussis*. W kolejnych badaniach postanowiono więc określić występowanie przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG dla tych dwóch białek pałeczek krztuśca (17).

Przeprowadzone badania wykazały, że w przebiegu zakażeń wywoływanych przez *B. pertussis* produkowane są przeciwciała należące do wszystkich podklas IgG dla obydwu użytych antygenów. Najczęściej wykrywano przeciwciała podklasy IgG1 (dla toksyny krztuścowej u 82,5% osób oraz dla włóknikowej hemaglutyniny u 76,7% osób), najrzadziej zaś podklasy IgG3. Stwierdzono również, że przeciwciała podklasy IgG4 występowały statystycznie istotnie częściej u mężczyzn niż u kobiet, a częstość ich wykrywania malała wraz z wiekiem badanych osób. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano istotnych różnic w poziomie przeciwciał należących do poszczególnych podklas IgG w zależności od okresu choroby.

Poziom przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG dla antygenów pałeczek *B. pertussis* w surowicy osób z krztuścem opisany został także przez innych autorów. *Giammanco* i wsp. (5) wykazali, że u nieszczepionych dzieci z przebyłym zakażeniem wywołanym przez *B. pertussis* dominowały przeciwciała podklasy IgG1 i IgG3, natomiast u dzieci szczepionych bezkomórkową szczepionką, zarówno zdrowych jak i po przebyłym krztuścu, w największym stężeniu produkowane były przeciwciała podklasy IgG1, IgG2 i IgG4. Według *Zaitsev* i wsp. (32), wysoki poziom przeciwciał podklasy IgG3 jest charakterystyczny dla ostrej fazy zakażenia pałeczkami *B. pertussis*. *Zackrisson* i wsp. (31) wykryli obecność przeciwciał podklasy IgG1 i IgG3 dla toksyny krztuścowej odpowiednio w 92% i 42% próbek surowicy osób z krztuścem. Poziom tych przeciwciał nie był skorelowany z wiekiem badanych osób. Przeciwciała podklasy IgG2 i IgG4 były obecne tylko w odpowiednio 5% i 10% próbek surowicy. Autorzy ci wykazali duże różnice w poziomie przeciwciał podklasy IgG4 u badanych chorych osób. Według *Hendrikx* i wsp. (8) w przebiegu krztuśca indukowane są przeciwciała, zarówno dla toksyny krztuścowej, włóknikowej hemaglutyniny i pertaktyny, głównie podklasy IgG1. Przeciwciała podklasy IgG2, IgG3 i IgG4 występowały w niewielkim odsetku próbek surowicy osób z krztuścem. Autorzy ci nie stwierdzili istotnych różnic w częstości występowania przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG w zależności od wieku badanych osób.

Tularemia. We wcześniej przeprowadzonych badaniach wykazano, że w przebiegu tularemii dochodzi do wytwarzania wysokiego poziomu swoistych immunoglobulin klasy G (28). Ze względu jednak na brak w dostępnym piśmiennictwie danych dotyczących udziału przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG w odpowiedzi humoralnej w przebiegu naturalnego zakażenia pałeczkami *F. tularensis* postanowiono, że następnym celem badań będzie ocena występowania przeciwciał dla pałeczek *F. tularensis* w poszczególnych podklasach IgG w próbkach surowicy osób z tularemią. Antygen w naszych badaniach stanowiła zawiesina inaktywowanych pałeczek *F. tularensis* rozbitych ultradźwiękami. Przeprowadzone badania wykazały obecność przeciwciał podklasy IgG1 u 73,2%, podklasy IgG2 u 92,9% i podklasy IgG3 u 23,2% zbadanych osób z tularemią. W badanych próbkach surowicy osób chorych nie wykazano obecności przeciwciał podklasy IgG4 na diagnostycznie znamiennej poziomie (21). W swoich badaniach, *Bavanger* i wsp. (2) wykazali, że lipopolisacharydy odgrywają główną rolę w stymulowaniu produkcji przeciwciał w ostrej fazie zakażenia wywołanego pałeczkami *F. tularensis*. Tak więc, w próbkach surowicy osób z tularemią należałoby spodziewać się przede wszystkim przeciwciał podklasy IgG2. Faktycznie, w przeprowadzonych przez nas badaniach, przeciwciała tej podklasy zdecydowanie dominowały w badanych próbkach surowicy, osiągając z reguły 2-3 krotnie wyższe poziomy niż przeciwciała podklasy IgG1 i IgG3.

Mykoplazmoza. Jednym z niewielu doniesień dotyczących występowania przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG dla antygenów *M. pneumoniae* u osób z mykoplazmozą jest praca *Seggev* i wsp. (23), w której autorzy wykryli u osób chorych obecność przeciwciał podklasy IgG1 i IgG3 (odpowiednio w 73,7% oraz 68,8% próbek surowicy), oraz znacznie rzadziej obecność przeciwciał podklasy IG2 i IgG4 (odpowiednio w 41,2% i 31,3% próbek surowicy). W badaniach własnych przeciwciała podklasy IgG1 stwierdzono w 34,1% próbkach, podklasy IgG2 w 30,4% i podklasy IgG3 w 42,0% próbkach surowicy. W żadnej próbce surowicy nie wykazano obecności przeciwciał podklasy IgG4 w mianie diagnostycznie znamiennej. Wykazano również, że poziom przeciwciał podklasy IgG2 dla *M. pneumoniae* narasta wraz z wiekiem badanych osób chorych (16).

Zakażenia werotoksycznymi pałeczkami *E. coli* (VTEC). Werotoksyczne pałeczki *E. coli* odpowiedzialne są za wywoływanie 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 (25). We wcześniej przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że w przebiegu zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) u dzieci dochodzi do wytwarzania wysokiego poziomu swoistych przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM, zarówno dla lipopolisacharydów jak i dla rekombinowanych białek: werotoksyny 2b, intyminy i białka Tir (18, 19).

W celu oceny występowania przeciwciał dla pałeczek VTEC w poszczególnych podklasach IgG w próbkach surowicy dzieci z zespołem-hemolityczno-mocznicowym zbadano 17 próbek surowicy, w których we wcześniej wykonanych, rutynowych badaniach odczynem ELISA, stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał klasy IgG dla LPS oraz rekombinowanych białek pałeczek *E. coli*. Przeprowadzone badania wykazały, że w przebiegu zakażenia VTEC najczęściej wykrywano przeciwciała podklasy IgG1 i IgG2 dla LPS, następnie dla intyminy i białka Tir oraz dla werotoksyny 2b. Przeciwciała podklasy IgG3, a zwłaszcza podklasy IgG4 dla rekombinowanych białek w badanych próbkach surowicy diagnozowano znacznie rzadziej (20).

Inne zakażenia bakteryjne. Przegląd dostępnego piśmiennictwa dotyczącego występowania przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG w przebiegu różnych zakażeń bakteryjnych dostarcza wielu ciekawych informacji, aczkolwiek w niektórych przypadkach nieco wyrywkowych. Nie mniej jednak, dla zaprezentowania całości zagadnienia, przedstawiono poniżej wybrane pozycje dotyczące tej tematyki.

Według *Islam* i wsp. (10) w przebiegu zakażenia pałeczkami *Shigella* w początkowej fazie zakażenia powinowactwo przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG do LPS wynosi odpowiednio: IgG2>IgG1>IgG3>IgG4, w późniejszej zaś fazie choroby: IgG2>IgG3>IgG1>IgG4. W przypadku antygeny białkowego powinowactwo przeciwciał zmienia się odpowiednio z: IgG1>IgG3>IgG2>IgG4 na: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4.

Widhe i wsp. (30) wykryli w surowicy jak i w płynie rdzeniowo-mózgowym u chorych na boreliozę obecność przeciwciał podklasy IgG1 i IgG3 dla białka flagelliny *B. burgdorferi*. Przeciwciała podklasy IgG3 występowały na niskim poziomie, natomiast przeciwciała podklasy IgG4 nie były wykrywane.

Według *Sousa* i wsp. (26) w postaci tuberkuloidowej trądu, zarówno dla antygenów wielocukrowych jak i antygenów białkowych prątków *Mycobacterium leprae*, dominują przeciwciała podklasy IgG1 natomiast w postaci lepromatycznej przeciwciała podklasy IgG2.

U osób z melioidozą *Chenthamarakshan* i wsp. (9) wykazali obecność przeciwciał należących głównie do podklas IgG1 i IgG2 dla pałeczek *Burkholderia pseudomallei*.

O'Brien-Simpson wsp. (13) wykrył u osób z periodontitis wysoki poziom przeciwciał podklasy IgG4 i IgG2 i znacznie niższy poziom przeciwciał podklasy IgG3 i IgG1 dla antygenów *Porphyromonas gingivalis*.

W przypadku ostrego jak i przewlekłego zakażenia wywołanych przez *Coxiella burnetii* *Capo* i wsp. (3) stwierdzali obecność przeciwciał jedynie podklasy IgG1 i IgG3. Ich stężenie w surowicy nie było skorelowane, co zdaniem autorów, świadczy o różnej roli jaką odrywają podczas zakażenia.

McGill i wsp. (12) wykryli odczynem western-blotting w surowicy osób zakażonych *Bartonella henselae* obecność przeciwciał dla białka Bh83 wyłącznie podklasy IgG1.

Według Perez-Perez i wsp. (14) wzajemny stosunek stężenia przeciwciał podklasy IgG1 do przeciwciał IgG4 dla antygeny *H. pylori* u osób chorych waha się od 10:1 do 20:1. Dzierżanowska-Fangrat i wsp. (4) wykazali z kolei, że w przebiegu zakażenia *H. pylori* u dzieci dominującymi przeciwciałami dla rekombinowanego białka CagA są IgG1 i IgG3. Również Vorobjova i wsp. (29) stwierdzili wysokie poziomy przeciwciał IgG1 dla białka CagA u osób z rakiem żołądka wywołanym zakażeniem *H. pylori*.

Przeciwciała podklasy IG1-IgG4 dla LPS *Bacteroides gingivalis* były również poszukiwane w próbkach surowicy osób z periodontitis (22). Najwyższy poziom osiągały przeciwciała podklasy IgG2, znacznie niższy przeciwciała podklasy IgG1. Przeciwciała podklasy IgG3 i IgG4 nie były wykrywane.

Shackelford i wsp. (24) wykazali, że u osób szczepionych polisacharydową szczepionką dla *H. influenzae* typu b dominują przeciwciała podklasy IgG1 i IgG2.

PODSUMOWANIE

Podsumowując ten krótki przegląd piśmiennictwa należy stwierdzić, że odpowiedź humoralna w podklasach IgG w przebiegu zakażeń bakteryjnych zależy od gatunku drobnoustrojów wywołującego chorobę, rodzaju antygeny, drogi i czasu jaki upłynął od ekspozycji na antygen a także stanu kompetencji immunologicznej zakażonej osoby. Badanie poziomu swoistych przeciwciał w poszczególnych podklasach IgG pozwala na uzyskanie lepszego wglądu w kinetykę odpowiedzi humoralnej w przebiegu zakażeń bakteryjnych, ocenę skuteczności szczepień ochronnych a także uzyskanie informacji przydatnych w ocenie niektórych niedoborów odporności.

PIŚMIENNICTWO

1. Berkel AI, Tezcan I, Ersoy F, Sanal O. Serum immunoglobulin G subclass values in healthy Turkish children and adults. Turk J Pediatr 1994; 36: 197-204.
2. Bevanger L, Maeland JA, Kvam AI. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1: 238-40.
3. Capo C, Iorgulescu I, Mutillod M i inni. Increases in the levels of *Coxiella burnetii*-specific immunoglobulin G1 and G3 antibodies in acute Q fever and chronic Q fever. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5: 814-6.
4. Dzierżanowska-Fangrat K, Raeiszadeh M, Dzierżanowska D i inni. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* and CagA antigens in children. Clin Exp Immunol 2003; 134: 442-6.
5. Giammanco A, Taormina S, Chiarini A i inni. Analogous IgG subclass response to pertussis toxin in vaccinated children, healthy or affected by whooping cough. Vaccine 2003; 21: 1924-31.
6. Gregorek H, Imielska D, Gornicki J i inni. Development of IgG subclasses in healthy polish children. Arch Immunol Ther Exp 1994; 42: 377-82.
7. Hamilton RG. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin Chem 1987; 33: 1707-25.

8. Hendriks LH, Schure RM, Öztürk K i inni. Different IgG-subclass distributions after whole-cell and acellular pertussis infant primary vaccinations in healthy and pertussis infected children. *Vaccine* 2011; 29: 6874-80.
9. Chenthamarakshan V, Kumutha MV, Vadivelu J, Puthuchery SD. Distribution of immunoglobulin classes and IgG subclasses against a culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei* in melioidosis patients. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 55-61.
10. Islam D, Wretling B, Ryd M i inni. Immunoglobulin subclass distribution and dynamics of Shigella-specific antibody responses in serum and stool samples in shigellosis. *Infect Immun* 1995; 63: 2054-61.
11. Jakóbiński M. Przeciwciała, str. 25-33. W: Immunologia. Red. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
12. McGill SL, Regnery RL, Kareem KL. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 1998; 66: 5915-20.
13. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4: 409-26.
14. Perez-Perez GI, Maw AM, Feingold-Link L i inni. Longitudinal analysis of serological responses of adults to *Helicobacter pylori* antigens. *J Infect Dis* 2010; 202: 916-23.
15. Rastawicki W, Jakubczak A. Serum immunoglobulin IgG subclass distribution of antibody responses to Yop proteins and lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* in patients with yersiniosis. *Pol J Microbiol* 2007; 56: 233-8.
16. Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Występowanie przeciwciał dla antygenów *Mycoplasma pneumoniae* w poszczególnych podklasach IgG w przebiegu mykoplazmozy. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 375 – 9.
17. Rastawicki W, Śmietańska K, Rokosz-Chudziak N, Jagielski M. Występowanie przeciwciał dla toksyny krztuścowej i włóknikowej hemaglutyniny *Bordetella pertussis* w poszczególnych podklasach IgG w przebiegu krztuśca. *Med Dośw Mikrobiol* 2013; 65: 269 – 74.
18. 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.
19. Rastawicki W, Śmietańska K, Chróst A i inni. Wykorzystanie wybranych, rekombinowanych białek w serodiagnostyce zakażeń wywołanych przez werotoksyczne pałeczki *Escherichia coli* (VTEC) u ludzi. *Med Dośw Mikrobiol* 2016; 68: 183-90.
20. Rastawicki, Gielarowiec K, Chróst A. Występowanie przeciwciał dla rekombinowanych białek i lipopolisacharydów werotoksycznych pałeczek *Escherichia coli* (VTEC) w poszczególnych podklasach IgG u dzieci z zespołem hemolityczno-mocznicowym. *Med Dośw Mikrobiol* 2017, 69: 127 – 41.
21. Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N, Wolaniuk N. Występowanie przeciwciał dla pałeczek *Francisella tularensis* w poszczególnych podklasach IgG u osób z tularemią. *Med Dośw Mikrobiol* 2014; 66: 11 – 5.
22. Schenck K, Michaelsen TE. IgG subclass distribution of serum antibodies against lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis* in periodontal health and disease. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1987; 95: 41-6.

23. Seggev JS, Sedmak GV, Kurup VP. Isotype-specific antibody response to acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 67-73.
24. Shackelford PG, Granoff DM, Nelson SJ i inni. Subclass distribution of human antibodies to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Immunol* 1987; 138: 587-92.
25. Sieniawska M, Wyszyńska T. Nefrologia dziecięca. Tom 2. Biblioteka lekarza Specjalisty. Warszawa 2003.
26. Sousa AO, Henry S, Marója FM i wsp. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 48-55.
27. Spiegelberg HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* 1974; 303: 178-82.
28. Viljanen MK, Nurmi T, Salminen A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen form IgM, IgA, and IgG antibodies to *Francisella tularensis*: comparison with bacterial agglutination test and ELISA with lipopolysaccharide antigen. *J Infect Dis* 1983; 148: 715-20.
29. Vorobjova T, Ren Z, Dunkley M i inni. Response of IgG1 and IgG2 subclasses to *Helicobacter pylori* in subjects with chronic inflammation of the gastric mucosa, atrophy, and gastric cancer in a country with high *Helicobacter pylori* infection prevalence. *APMIS*. 2006; 114: 372-80.
30. Widhe M, Ekerfelt C, Forsberg P. IgG subclasses in Lyme borreliosis: A study of specific IgG subclass distribution in an interferon-g-predominated disease. *Scand J Immunol* 1998; 47: 575- 81.
31. Zackrisson G, Lagergard T, Trollfors B. Subclass compositions of immunoglobulin G to pertussis toxin in patients with whooping cough, in healthy individuals, and in recipients of a pertussis toxoid vaccine. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1567-71.
32. Zaitsev EM, Krasnoproshina LI, Mazurova IK i inni. Isotypes of anti-pertussis antibodies in pertussis patients at different stages of the disease. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2011; 3: 53-6.

Otrzymano: 15 X 2018 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych NIZP-PZH w Warszawie

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

Książki i monografie

1. (Autorzy) *Juszczyk 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.

