MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

ORGAN NARODOWEGO INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO PZH
– PAŃSTWOWEGO INSTYTUTU BADAWCZEGO

1-4

ROK LXXIII KWARTALNIK 2021
NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO PZH
– PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA
Organ Narodowego Instytut Zdrowia Publicznego PZH
– Państwowego Instytutu Badawczego

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 – 20 pkt.
Index Copernicus – 87,06 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 PZH – Państwowy Instytut Badawczy) w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO PZH
– PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Skład i druk: Agencja Reklamowa TOP, ul. Chocimska 4, 87-800 Włocławek,
tel.: 54 427 09 70, www.agencjatop.pl

SPIS TREŚCI

PRACE ORYGINALNE

K. Markowska, M. Kierzkowska, D. Kawecki, A. Majewska. *Staphylococcus prettenkoferi* – właściwości biochemiczne, metody identyfikacji gatunku i znaczenie kliniczne 5

M. Wawrzyniak, J. Czekajewska, M. Kosecka-Strojek, P. Nowak. Ocena występowania genetycznych determinant warunkujących wielolekooporność wśród szczepów z gatunku *Acinetobacter baumannii* 15

W. Rastawicki, K. Płaza, A. Pietrusiński. Ocena przydatności szybkich, kasetkowych testów immunochromatograficznych w serologicznej diagnostyce COVID-19 25

W. Rastawicki, K. Płaza, A. Pietrusiński. Ocena przydatności testu immunoenzymatycznego ELISA opracowanego we własnym zakresie (in-house ELISA) oraz 11 komercyjnych zestawów ELISA w serologicznej diagnostyce COVID-19 39

PRACE POGLĄDOWE

M.A. Nowakowska. Cefalosporynazy AmpC u *Escherichia coli* 53

S. Wardak. Mikrobiota jelitowa człowieka - jej zróżnicowanie i wpływ na nasze zdrowie 71

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

K. Markowska, M. Kierzkowska, D. Kawecki, A. Majewska. *Staphylococcus prettenkoferi* - biochemical properties, methods of species identification and clinical significance 5

M. Wawrzyniak, J. Czekajewska, M. Kosecka-Strojek, P. Nowak. Evaluation of the occurrence of genetic determinants of multi-drug resistance among *Acinetobacter baumannii* strains 15

W. Rastawicki, K. Płaza, A. Pietrusiński. Evaluation of rapid, cassette immunochromatographic tests in the serological diagnosis of COVID-19 25

W. Rastawicki, K. Płaza, A. Pietrusiński. Evaluation of in-house ELISA and 11 commercial ELISA kits in the serological diagnosis of COVID-19 39

REVIEWS

M.A. Nowakowska. AmpC cephalosporinases in *Escherichia coli* 53

S. Wardak. Human gut microbiota – its diversity and impact on our health 71

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2021,73: 5-14 https://doi.org/10.32394/mdm.73.01

Staphylococcus prettenkoferi – właściwości biochemiczne, metody identyfikacji gatunku i znaczenie kliniczne

Staphylococcus prettenkoferi – biochemical properties, methods of species identification and clinical significance

Kinga Markowska, Marta Kierzkowska[*]*, Dariusz Kawecki, Anna Majewska*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Staphylococcus pettenkoferi **wyizolowano po raz pierwszy z posiewu krwi od 25-letniego chorego, u którego występowała gorączka o nieustalonej etiologii. Na podstawie analizy piśmiennictwa można uznać, że jest drobnoustrojem oportunistycznym, składnikiem mikrobiomu człowieka oraz występuje w środowisku szpitalnym. Powoduje zakażenia łożyska naczyniowego. Wykazano jego związek etiologiczny z zakażeniem kości i szpiku kostnego. Gatunek ten izolowano również od zwierząt i ich otoczenia.**

Słowa kluczowe: *bakteriemia, gronkowce koagulazo-ujemne, spektrometria masowa, Staphylococcus pettenkoferi,*

ABSTRACT

Staphylococcus pettenkoferi was first isolated from blood culture a 25-years-old patient with fever of unknown etiology. Based on the literature analysis, it was found that it is an opportunistic microorganism. It causes blood stream infections and was an causative agent of osteomyelitis. *Staphylococcus pettenkofer*i is a component of the human microbiome, was found in a hospital environment and was also isolated from animals and their surroundings.

Key words: *bacteremia, coagulase-negative staphylococcus, mass spectrometry, Staphylococcus pettenkoferi,*

* Autor korespondujący

WSTĘP

Gronkowce koagulazo-ujemne (CNS) to licznie reprezentowana grupa Gram-dodatnich ziarenkowców, które powszechnie występują w środowisku. Wiele gatunków kolonizuje zwierzęta oraz stanowi mikrobiom człowieka. CNS zasiedlają skórę i błony śluzowe, zwłaszcza w jamie nosowo-gardłowej i w okolicy odbytu, występują także w przewodzie pokarmowym i pochwie. Uznawane są za bakterie o niskim potencjale patogennym, ale w określonych warunkach (zależnych od gospodarza, zjadliwości szczepu, czy też w przypadku translokacji poza miejsce naturalnego bytowania, np. po przerwaniu ciągłości tkanek) mogą wywoływać zakażenia oportunistyczne (16). W przebiegu zakażeń u ludzi najczęściej izolowane są następujące gatunki CNS: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus, S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans* i *S. warneri*. CNS mogą być etiologicznie związane z zapaleniem wsierdzia, dróg moczowych, zapaleniem kości i szpiku, opon mózgowych, płuc, ucha, wnętrza gałki ocznej, zakażeniem rany. Translokacja bakterii do łożyska naczyniowego może spowodować bakteriemię i sepsę. W patologii tymi drobnoustrojami należy uwzględnić także zakażenie związane z obecnością cewników naczyniowych (catheter-related bloodstream infection; CR-BSI) (3, 12, 16, 23). Oddzielnym zagadnieniem jest właściwa interpretacja wyniku badania próbek krwi, z których wyhodowano CNS. Wykazanie kontaminacji próbki materiału biologicznego lub uznanie CNS za czynnik etiologiczny zakażenia wymaga uwzględnienia klinicznych i mikrobiologicznych zaleceń ekspertów z Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) oraz trzeciej międzynarodowej definicji sepsy i wstrząsu septycznego (5, 24, 28).

CNS charakteryzują się relatywnie niską patogennością, jednak zdolność do nieswoistej adhezji umożliwia kolonizację i zakażenie związane z obecnością biomateriału tj. protezy, implantu, sztucznych zastawek, cewnika oraz rozrusznika (10, 16). Bakterie te szczególnie często są przyczyną zakażeń u pacjentów ze skrajnych grup wiekowych (wcześniaków, noworodków, osób starszych), osób z obniżoną odpornością, czy też chorych leczonych w oddziałach intensywnej terapii (16).

Niektóre gatunki CNS występują u zwierząt towarzyszących człowiekowi (psy, koty) i zwierząt hodowlanych oraz mogą być przeniesione na człowieka wywołując zooantroponozy. Co więcej, patogeny zwierzęce są rezerwuarem genów, których produkty mogą powodować ograniczoną wrażliwość lub oporność na leki przeciwdrobnoustrojowe (10).

Celem pracy jest podsumowanie wiedzy na temat *Staphylococcus pettenkoferi* – gatunku koagulazo-ujemnego gronkowca, opisanego po raz pierwszy przez *Trülzsch* i wsp. (32) w 2002 roku i nazwanego na cześć niemieckiego pioniera w dziedzinie higieny i zdrowia publicznego Maxa von Pettenkofera (1818–1901).

CHARAKTERYSTYKA *S. PETTENKOFERI*

Właściwości biochemiczne *S. pettenkoferi* i metody identyfikacji gatunku. *Staphylococcus pettenkoferi* to fakultatywnie beztlenowa, mezofilna, Gram-dodatnia bakteria. Na podłożach mikrobiologicznych (np. Columbia agar) wzrasta w ciągu 1-2 dni tworząc kolonie, które mogą wytwarzać żółty pigment. Komórki, o okrągłym kształcie, występują

pojedynczo, w parach lub skupiskach. Kolonie są gładkie, nieprzezroczyste, opalizujące, o równych brzegach i wielkości 1-2 mm. Identyfikacja bakterii tego gatunku na podstawie właściwości biochemicznych jest istotnie utrudniona ze względu na niską aktywność drobnoustroju (Tabela I), wykrywaną w testach komercyjnych (np. API ID 32 Staph, bioMérieux Francja). *S. pettenkoferi* nie wytwarza czynnika skupiania (clumping factor; CF) i koagulazy. Aktywność enzymatyczna polega na wytwarzaniu katalazy oraz fosfatazy zasadowej. *S. pettenkoferi* nie wytwarza oksydazy cytochromu c (25, 30, 32). Pod względem właściwości fenotypowych, *S. pettenkoferi* wykazuje podobieństwo do *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus conii*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus warneri* (6, 14, 17, 19, 25, 29, 32). Szczepy tego gatunku błędnie klasyfikowano jako *Kocuria varians* (6, 17, 29), *Micrococcus lylae* (17), a nawet *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (14). Stosując fluorometryczne i kolorometryczne testy w systemie Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) uzyskano nieprawidłową identyfikację *S. pettenkoferi* jako *S. auricularis* (93-95%) i *S. warneri* (95%) (25). Większe możliwości prawidłowego rozpoznania gatunku uzyskano, stosując badania oparte na analizie białek, chociaż technika spektrometrii masowej Vitek MS IVD wersja 2.0 (bioMérieux) nie zidentyfikowała izolatu, bądź błędnie określiła *S. pettenkoferi* jako *S. capitis* lub *S. auricularis.* Prawdopodobieństwo zgodności wynosiło dla obu gatunków odpowiednio 96,3% i 99% (25). Uaktualnienie bazy gatunków bakterii w systemie Vitek MS IVD do wersji 3.0 umożliwiło precyzyjną identyfikację gatunku (zgodność na poziomie 99,9%) (14). Podobnie, zastosowanie analizatora MALDI BioTyper 2.3 (Bruker, Germany) i zaktualizowanej bazy systemu (wersje 3.0 i 3.1) pozwoliły na uzyskanie prawidłowego rozpoznania gatunku na poziomie 1,904-2,252 (11, 25, 33). Wyniki identyfikacji oparte na analizie białek potwierdzono w badaniu metodą sekwencjonowania 16S rRNA z zastosowaniem primerów: 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3', 27F 5'-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3′

Tabela I. Właściwości fenotypowe *S. pettenkoferi* w badaniu metodą API ID 32 STAPH [30, 31, 32].

API ID 32 STAPH											
URE	ADH (Arg)	ESC	GLU	FRU	MNE	LAC	TRE	MAN	RAF	RIB	NIT
-/+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+
VP	Beta GAL	ArgA	Pal	PyrA	NOV	SAC	NAG	TUR	ARA	Beta GUR -	
-	-	-	+	+	-	+/-	-	-	-		

Legenda: URE; wytwarzanie ureazy; ADH; wytwarzanie dihydrolazy argininowej, ESC; hydroliza eskuliny, GLU; fermentacja glukozy, FRU; fermentacja fruktozy, MNE; fermentacja mannozy, LAC; fermentacja laktozy, TRE; fermentacja trechalozy, MAN; fermentacja mannitolu, RAF; fermentacja rafinozy, RIB; fermentacja rybozy, NIT; redukcja azotanów, VP; wytwarzanie pirogronianu sodu, beta GAL; wytwarzanie β-galaktozydazy, ArgA; wytwarzanie arylamidazy L-argininy, Pal; wytwarzanie fosforanu β-naftylu, PyrA; wytwarzanie arylamidazy kwasu piroglutaminowego, NOV; wrażliwość na nowobiocynę, SAC; fermentacja sacharozy, NAG; fermentacja N-acetyloglukozaminy, TUR; fermentacja turanozy; ARA; fermentacja arabinozy, Beta GUR; wytwarzanie β-glukuronidazy

(19, 25) oraz 5′-CTACGGGAGGCAGCAGTGGG-3′, 5′-GGATTAGATACCCTGGTA-CTC-3′, 5′-GAGTACCAGGGTATCTAATCC-3′, 5′-GTGCCAGCAGCCGCGGTA-3′, 5′-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3′, 5′-GGATTAGATACCCTGGTAGTC-3′ (32). Identyfikacja szczepu możliwa jest również na podstawie charakterystyki molekularnej, wykonanej metodą amplifikacji genów *Sod*A (6), genu *tuf* (23) oraz *rpo*B (17).

Znaczenie kliniczne *S. pettenkoferi*. *S. pettenkoferi* wyizolowano po raz pierwszy z posiewu krwi od 25-letniego chorego, u którego występowała gorączka o nieustalonej etiologii. U pacjenta ostatecznie zdiagnozowano gruźlicę pozapłucną i skutecznie wyleczono ryfampicyną, pirazynamidem i etambutolem. Wyizolowanie *S. pettenkoferi* z próbki krwi ostatecznie uznano za jej kontaminację (31, 32). Korzystając z elektronicznej, medycznej bazy Pubmed znaleziono publikacje, opisujące znaczenie tego gatunku w zakażeniach ludzi oraz wrażliwość na antybiotyki. Autorzy wskazali na udział drobnoustroju w zakażeniach łożyska naczyniowego oraz w zapaleniu kości i szpiku kostnego (Tabela II). Krytyczna ocena przypadków klinicznych pozwala sądzić, że *S. pettenkoferi* jest drobnoustrojem oportunistycznym. Infekcje występowały u osób starszych, zwłaszcza z chorobami współistniejącymi (np. cukrzyca, nadciśnienie, zapalenie płuc, immunosupresja) (11, 12, 19, 23, 25, 33). Opisano także przypadki, kiedy z pobranych próbek krwi od osób chorych, wyizolowano *S. pettenkoferi*, jednak po analizie:

Tabela II. Opisy przypadków zakażeń z udziałem *S. pettenkoferi* [11, 17, 19, 20, 23, 25, 33].

Obraz kliniczny oraz metoda identyfikacji *S. pettenkoferi*	Ref.
88-letnia kobieta przyjęta do oddziału ratunkowego po upadku z objawami duszności i gorączką (39,2º). W wywiadzie ostry zawał mięśnia sercowego, wszczepienie bajpasów i sztucznego stymulatora serca (stymulacja dwukomorowa). Chora dementywna z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP). W badaniu obrazowym zagęszczenia miąższowe. W skali qSOFA przyznano 2 punkty (prawdopodobne rozpoznanie-sepsa). Z 3/4 próbek krwi wyhodowano *S. pettenkoferi* (MRCNS). Nie zidentyfikowano źródła zakażenia. Metoda identyfikacji: MALDI BioTyper wersja 2.3 (Bruker).	*Vecchia M.* 2018
75-letnia kobieta przyjęta do oddziału ratunkowego po upadku w mieszkaniu. W wywiadzie ustalono, że u chorej występuje nadciśnienie, cukrzyca typu 2, łuszczyca, dyslipidemia. Chora po zabiegu endoprotezoplastyki prawego kolana. W badaniu przedmiotowym stwierdzono wysypkę plamisto-grudkową na klatce piersiowej, rękach i nogach, a także dodatni wynik testu Dix-Hallpike. Założono cewnik do żyły obwodowej. Po 12 godzinach wystąpiła gorączka. W miejscu wprowadzenia cewnika pojawił się rumień. Z dwu pobranych z oddzielnych miejsc próbek krwi wyhodowano wrażliwy na oksacylinę *S. pettenkoferi* (MSCNS). Oceniono, że bakteriemia związana była z obecnym cewnikiem naczyniowym i translokacją *S. pettenkoferi* z powierzchni skóry do łożyska naczyniowego. Metoda identyfikacji: MALDI BioTyper (wersja 3.1) (Bruker).	*Hashi A.* 2015

49-letni mężczyzna przyjęty do OIT w celu leczenia operacyjnego pourazowego wodogłowia. Pacjent w śpiączce, żywiony za pomocą endoskopowej gastrostomii. Wykonano tracheostomię. Wszczepiono system zastawkowy komorowo-otrzewnowy (ventriculo-peritoneal shunt; VPD), który zastąpiono zewnętrzną komorą dziesięć dni później. Po kilku dniach rozpoznano wstrząs septyczny. *S. pettenkoferi* (MRCNS) wyizolowano z posiewów dwu próbek krwi, na tej podstawie rozpoznano zakażenie krwi. Nie wykazano alternatywnych przyczyn zakażenia (brak kolonizacji na zastawkach). Pacjent zmarł w skutek zatrzymania akcji serca. Metoda identyfikacji: sekwencjonowanie genu 16S rRNA.	*Mammina C.* 2011
Mężczyzna 72 lat, w wywiadzie choroba alkoholowa, nadciśnienie, cukrzyca. Rozpoznano aspiracyjne zapalenie płuc, wstrząs septyczny. Z dwu spośród trzech pobranych z oddzielnych wkłuć próbek krwi (2/3) wyizolowano *S. pettenkoferi* (MSCNS). Metoda identyfikacji: sekwencjonowanie genu 16S rRNA, MALDI BioTyper (Bruker).	*Park S.* 2015
Mężczyzna 45 lat, zakażony HIV, z rozpoznanym półpaścem i wirusowym zapaleniem wątroby typu C (HCV) oraz toksoplazmozą mózgową w wywiadzie. Chory zaintubowany, z założonym centralnym cewnikiem naczyniowym. Pobrano 2 próbki krwi, z obu (2/2) wyizolowano *S. pettenkoferi.* Pacjent zmarł. Metoda identyfikacji: sekwencjonowanie genu 16S rRNA oraz *tuf* i *sod*A.	*Morfin-Otero R.* 2012
Mężczyzna 63 lat, chory na cukrzycę, od 2 lat obserwowany w kierunku przewlekłego zakażenia stopy cukrzycowej. Przyjęty na oddział ortopedyczny z powodu nasilenia miejscowych objawów septycznych. Badanie obrazowe okolicy stawu potwierdziło rozpoznanie zapalenia kości i szpiku. Wykonano amputację Choparta. Podczas zabiegu pobrano materiał z biopsji kości. W 4(4/6) próbkach krwi uzyskano wzrost *S. pettenkoferi* (monokultura). Metoda identyfikacji: sekwencjonowanie 16S oraz *rpo*B.	*Loïez* C. 2007
Mężczyzna 85 lat przyjęty na oddział ratunkowy z pogorszeniem stanu ogólnego. oraz mężczyzna 75 lat, z przewlekłą białaczką limfocytową przyjęty na oddział zakaźny z powodu gorączki neutropenicznej. U obu chorych pobrano cztery próbki krwi, z dwu wyizolowano *S. pettenkoferi* (MRCNS). Metoda identyfikacji: MALDI BioTyper (wersja 3.1) (Bruker).	*Månsson E.* 2017

Legenda: OIT; oddział intensywnej terapii, qSOFA; skala niewydolności narządów związanej z sepsą (quick Sepsis-related Organ Failure Assessment), MRCNS; metycylinooporny, koagulozo-ujemny szczep bakterii rodzaju *Staphylococcus*, methicyllin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*; MSCNS, metycylinowrażliwy, koagulozo-ujemny szczep bakterii rodzaju *Staphylococcus*, methicyllin-sensitive coagulase-negative *Staphylococcus*

- wyniku badania mikrobiologicznego uwzględniającego, np. liczbę pobranych próbek krwi oraz liczbę próbek dodatnich i/lub jednoczesne wyhodowanie innych drobnoustrojów (mikroflora mieszana) oraz
- kryteriów klinicznych rozpoznania zakażenia (na podstawie zaleceń CDC oraz trzeciej definicji sepsy i wstrząsu septycznego)

wykluczono udział *S. pettenkoferi* w zakażeniu i oceniono, że wyhodowanie bakterii było następstwem zanieczyszczenia próbki szczepem kolonizującym chorego albo występującym w środowisku (3, 6, 8, 13, 20, 21, 29).

Uzupełnieniem przytoczonych danych z piśmiennictwa są własne obserwacje autorów. W 2019 roku w czasie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej z próbek krwi pobranych od dwóch pacjentów przyjętych do Szpitalnego Oddziału Ratunkowego (SOR) wyizolowano *S. pettenkoferi*. Na podstawie danych klinicznych oraz liczby badanych próbek i czasu wyhodowania bakterii można uznać, że w obu przypadkach, z dużym prawdopodobieństwem, *S. pettenkoferi* uczestniczył w etiologii choroby.

Opisy przypadków:

1. Kobieta w wieku 97 lat została przyjęta do SOR z rozpoznanym zapaleniem płuc. Chora z przewlekłą (schyłkową) niewydolnością nerek, dializowana. Pobrano jedną próbkę krwi do badania mikrobiologicznego i wprowadzono do dwóch podłóż hodowlanych systemu BacT/ALERT (bioMérieux, Francja) bulion tryptozowo-sojowy; (TBS umożliwia wzrost bakterii beztlenowych, a suplementowany TBS umożliwia wzrost bakterii tlenowych). Uzyskano wzrost drobnoustroju w pierwszej dobie od pobrania, w jednym podłożu hodowlanym. Wyhodowany izolat zidentyfikowano za pomocą techniki spektrometrii masowej (MALDI-TOF MS wersja 3.0; bioMérieux) jako *S. pettenkoferi.* Z reguły inokulum patogenu odpowiedzialnego za bakteriemię z klinicznymi jej następstwami jest wyższe, a czas od rozpoczęcia hodowli do otrzymania wyniku dodatniego (time to positivity; TTP) jest krótki (do około 24-36 godz.). Pojedyncze pobranie próbki krwi utrudnia właściwą interpretację wyniku badania. Istotnym uzupełnieniem, sugerującym wzrost patogennego drobnoustroju, może być zatem szybka detekcja wzrostu bakterii (z powodu dużego inokulum w łożysku naczyniowym) oraz brak alternatywnych przyczyn zakażenia. Wyhodowany szczep był oporny na oksacylinę (MIC ≥4) i cefoksytynę (MRCNS; metycylino-oporny szczep gronkowca koagulazo-ujemnego). Dodatkowo wykazywał oporność na klindamycynę (MIC=0,5), ciprofloksacynę (MIC≥8), lewofloksacynę (MIC≥8). Był wrażliwy na trimetoprim/sulfametoksazol (MIC≤10) i glikopeptydy, tj. wankomycynę (MIC=1) i teikoplaninę (MIC=2). U chorej rozpoznano zespół ostrej niewydolności oddechowej (acute respiratory distress syndrome; ARDS). Chora zmarła w 2 dobie od przyjęcia na SOR.

2. Mężczyzna w wieku 77 lat przyjęty na SOR z rozpoznaniem zapalenia płuc. W badaniu obrazowym stwierdzono drobnoplamiste zagęszczenia, zwłóknienie i rozedmę płuc. Chory z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP), przewlekłą niewydolnością nerek, dializowany. W dniu przyjęcia pobrano próbkę krwi do badania mikrobiologicznego. Wyhodowano *S. pettenkoferi* z obydwu podłóż hodowlanych. Izolat był oporny na oksacylinę (MIC=0,5; MRCNS). Zgodnie z wynikiem antybiogramu wykazano wrażliwość szczepu na tigecyklinę (MIC≤0,12), tetracyklinę (MIC≤1), gentamicynę (MIC≤0,5), erytromycynę (MIC=1,0), klindamycynę (MIC≤0,25), trimetoprim/sulfametoksazol (MIC≤10), ciprofloksacynę (MIC≤0,5), wankomycynę (MIC≤0,5), teikoplaninę (MIC=1,0), lewofloksacynę (MIC=0,5). Wyniki hodowli krwi pobranej po 48 i 72 godzinach były ujemne. W obu badaniach antybiogram został wykonany z wykorzystaniem automatycznego systemu do oceny lekowrażliwości drobnoustrojów (Vitek 2, bioMérieux). Oznaczono najmniejsze stężeniu antybiotyku lub chemioterapeutyku (mg/l) hamu-

jące wzrost szczepu bakterii (minimum inhibitory concentration; MIC) z interpretacją wg. rekomendacji Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; EUCAST) (2).

Z opublikowanych doniesień wynika, że *S. pettenkoferi* izolowano również ze środowiska oraz od zwierząt. Wykazano obecność *S. pettenkoferi* w pomieszczeniach szpitalnych (9, 20, 29), na śrubach używanych do zespolenia kręgosłupa (1) oraz w środowisku domowym (18, 22). Wielolekooporny szczep *S. pettenkoferi* występował w płynie z jamy brzusznej pobranym od kota z zapaleniem otrzewnej (7). Drobnoustrój izolowano również z jamy ustnej królików, psa, kotów (15, 26). *Weiß* (34) wyizolował dwa szczepy *S. pettenkoferi* ze środowiska zwierząt (miska do karmienia i koc w klatce kota). Obydwa izolaty posiadały kasetę SCC*mec* typu IV. Szczepy były oporne na antybiotyki β-laktamowe (obecność genów *bla*Z i *mec*A) na makrolidy i linkozamidy (*erm*C), spektynomycynę (*spc*) i na enrofloksacynę. Jeden z izolatów był również oporny na trimetoprim/sulfametoksazol i zawierał geny oporności na trimetoprim (*dfr*S1) i (*dfr*K) (34). *S. pettenkoferi* obecny był również w próbkach pobranych na fermie trzody chlewnej (9). Należy zauważyć, że ryzyko przenoszenia mikroorganizmów ze zwierząt na ludzi jest problemem ogólnoświatowym (15).

Lekowrażliwość. W ostatnich latach obserwowane jest narastanie oporności gatunków CNS na antybiotyki, a opcje leczenia przeciwbakteryjnego mogą być znacznie

Tabela III. Wyniki lekowrażliwości 71 izolatów *S. pettenkoferi* [8, 14, 20, 21, 25, 35].

Ref.		*Eke U.* 2020	*Kang H.* 2019	*Mansson E.* 2017	*Park S.* 2014	*Xu Z.* 2018	*Mihaila L.* 2012
Liczba izolatów *S. pettenkoferi*		35	2	16	6	3	9
Odsetek szczepów opornych na antybiotyk	oksacylina	65,7%	100%	nb	83,3%	0%	nb
	ofloksacyna	nb	nb	nb	nb	nb	100%
	metycylina	nb	nb	nb	nb	nb	100%
	cefoksytyna	nb	nb	18,75%	nb	nb	nb
	amoksycylina	nb	nb	nb	nb	33%	nb
	penicylina	nb	nb	nb	83,3%	33%	nb
	erytromycyna	34,3%	50%	18,75%	83,3%	0%	100%
	klindamycyna	25,7%	50%	12%	33,3%	0%	100%
	linezolid	nb	nb	nb	0%	nb	100%
	kwas fusydynowy	nb	nb	18,75%	nb	67%	nb
	ryfampicyna	0%	nb	0%	nb	nb	nb
	trimetoprim/ sulfametoksazol	nb	0%	6,25%	33,3%	nb	nb
	norfloksacyna	nb	nb	6,25%	nb	nb	nb
	ciprofloksacyna	nb	50%	nb	83,3%	nb	nb
	wankomycyna	0%	0%	nb	0%	nb	nb
	teikoplanina	nb	nb	nb	0%	nb	nb
	gentamicyna	0%	0%	0%	0%	0%	nb
	streptomycyna	nb	nb	nb	nb	67%	nb

Legenda: nb; nie badano

ograniczone. Wyniki przeprowadzone w różnych ośrodkach dotyczące oporności 71 izolatów *S. pettenkoferi* na antybiotyki przedstawiono w Tabeli III. Dodatkowo, *Mihaila i wsp.* (21) scharakteryzowali 9 szczepów wyizolowanych w latach 2007-2010 z próbek krwi pacjentów z chorobami wątroby (hepatektomia, marskość wątroby, ostre zapalenie wątroby, zakażenie HCV) hospitalizowanych we Francji w oddziale intensywnej terapii. Chorzy, przed ujawnieniem się klinicznie potwierdzonej bakteriemii lub zakażenia związanego z linią naczyniową, otrzymywali linezolid (600 mg/2 x dziennie). Wszystkie opisane szczepy były oporne na ten antybiotyk (MIC linezolidu 16 mg/l; LR-CNS). *Mansson i wsp.* (20) wyizolowali 16 szczepów *S. pettenkoferi* z krwi pacjentów. Tylko 12,5% izolatów było wrażliwych na więcej, niż trzy antybiotyki. Wszystkie szczepy charakteryzowały się wrażliwością na ryfampicynę oraz gentamycynę. *Savini i wsp.* (27) w 2014 roku wyizolowali z próbki krwi 86-letniego chorego (po 24 godzinach inkubacji w automatycznym systemie BacT/Alert) oporny na daptomycynę szczep *S. pettenkoferi.* Wrażliwość *S. pettenkoferi* na antybiotyki nie odbiega istotnie od profilu lekowrażliwości innych gatunków reprezentujących grupę CNS (4, 25). Najbardziej powszechna jest oporność na antybiotyki β-laktamowe, erytromycynę i klindamycynę.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionych wyników badań oraz własnych doświadczeń można stwierdzić, że *S. pettenkoferi* jest gatunkiem oportunistycznym. Jest składnikiem mikrobiomu człowieka, występuje w środowisku szpitalnym oraz u zwierząt. Dotychczas u ludzi opisano związek etiologiczny *S. pettenkoferi* z zakażeniami łożyska naczyniowego (często od osób z zapaleniem płuc) oraz jeden przypadek zakażenia kości i szpiku. Identyfikacja tego gatunku jest możliwa dzięki zastosowaniu w laboratoriach medycznych metod diagnostycznych, innych niż opartych na analizie profilu biochemicznego bakterii. Innowacją ostatnich kilkunastu lat jest spektrometria masowa, która identyfikuje drobnoustroje na podstawie analizy białek rybosomalnych. Obecnie technika analityczna MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) dostępna jest w systemie MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) oraz VITEK MS (bioMérieux). Z uwagi na wysokie odsetki opornych na antybiotyki gronkowców koagulazo-ujemnych, wskazane jest rutynowe monitorowanie lekowrażliwości i stosowanie terapii celowanej na podstawie wyniku antybiogramu. Nade wszystko, istotne jest właściwe interpretowanie wyniku badania mikrobiologicznego oceniające rzeczywisty udział *S. pettenkoferi* w zakażeniu lub kontaminację próbki materiału biologicznego szczepem CNS.

PIŚMIENNICTWO

1. *Agarwal A, Lin B, Wang JC* i inni. Efficacy of intraoperative implant prophylaxis in reducing intraoperative microbial contamination. Global Spine J 2019; 9: 62-6.
2. Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST (2021). Clinical breakpoints for bacteria, Version 11.0. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Access 20.06.2021).
3. *Argemi X, Hansmann Y, Prola K,* i inni. Coagulase-Negative Staphylococci pathogenomics. Int J Mol Sci 2019; 20: 1215.

4. *Barbier F, Ruppé E, Hernandez D* i inni. Methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2010; 202: 270-81.
5. *Centers for Disease Control and Prevention*. Collecting cultures: a clinician guide. https://wwwcdcgov/antibiotic-use/core-elements/collecting-cultureshtml, (Access 20.06.2021).
6. *d'Azevedo PA, Comin G, Cantarelli V.* Characterization of a new coagulase-negative *Staphylococcus* species (*Staphylococcus pettenkoferi*) isolated from blood cultures from a hospitalized patient in Porto Alegre, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43: 331-2.
7. *Dutta TK, Chakraborty S, Das M* i inni. Multidrug-resistant *Staphylococcus pettenkoferi* isolated from cat in India. Vet World 2018; 11: 1380-4.
8. *Eke UA, Fairfax MR, Mitchell R* i inni. *Staphylococcus pettenkoferi*-positive blood cultures in hospitalized patients in a multi-site tertiary center. Diagn Microbiol Infect Dis 2021; 99: 115284.
9. *Feld L, Bay H, Angen Ø,* i inni. Survival of LA-MRSA in dust from swine farms. Ann Work Expo Health 2018; 62: 147-56.
10. *França A, Gaio V, Lopes N,* i inni. Virulence factors in coagulase-negative *Staphylococci*. Pathogens 2021; 10: 170.
11. *Hashi AA, Delport JA, Elsayed S,* i inni. *Staphylococcus pettenkoferi* bacteremia: A case report and review of the literature. Can J Infect Dis Med Microbiol 2015; 26: 319-22.
12. *Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K*. Are coagulase-negative *staphylococci* virulent? Clin Microbiol Infect 2019; 25: 1071-80.
13. *Hitzenbichler F, Simon M, Salzberger B*, i inni. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than S. epidermidis blood stream isolates at a tertiary care hospital. Infection 2017; 45: 179-86.
14. *Kang H, Ryoo N*. Identification of *Staphylococcus pettenkoferi* isolated from blood culture. Clin Microbiol 2019; 22: 77.
15. *Kaspar U, von Lützau A, Schlattmann A,* i inni. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. PLoS One 2018; 13: e0208364.
16. *Lisowska-Łysiak K, Lauterbach R, Międzobrodzki J,* i inni. Epidemiology and pathogenesis of *Staphylococcus* bloodstream infections in humans: a review. Pol J Microbiol 2021; 70: 13-23.
17. *Loïez C, Wallet F, Pischedda P,* i inni. First case of osteomyelitis caused by *Staphylococcus pettenkoferi*. J Clin Microbiol 2007; 45: 1069-71.
18. *Madsen AM, Moslehi-Jenabian S, Islam MZ,* i inni. Concentrations of *Staphylococcus* species in indoor air as associated with other bacteria, season, relative humidity, air change rate, and *S. aureus*-positive occupants. Environ Res 2018; 160: 282-91.
19. *Mammina C, Bonura C, Verde MS,* i inni. A fatal bloodstream infection by *Staphylococcus pettenkoferi* in an intensive care unit patient. Case Rep Crit Care 2011: 612732.
20. *Månsson E, Hellmark B, Stegger M,* i inni. Genomic relatedness of *Staphylococcus pettenkoferi* isolates of different origins. J Med Microbiol 2017; 66: 601-8.

21. *Mihaila L, Defrance G, Levesque E,* i inni. A dual outbreak of bloodstream infections with linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus pettenkoferi* in a liver Intensive Care Unit. Int J Antimicrob Agents 2012; 40: 472-4.
22. *Mkrtchyan HV, Russell CA, Wang N,* i inni. Could public restrooms be an environment for bacterial resistomes? PLoS One 2013; 8: e54223.
23. *Morfin-Otero R, Martínez-Vázquez MA, López D,* i inni. Isolation of rare coagulase-negative isolates in immunocompromised patients: *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus pettenkoferi* and *Staphylococcus pasteuri*. Ann Clin Lab Sci 2012; 42: 182-5.
24. *Osaki S, Kikuchi K, Moritoki Y,* i inni. Distinguishing coagulase-negative *Staphylococcus* bacteremia from contamination using blood-culture positive bottle detection pattern and time to positivity. J Infect Chemother 2020; 26: 672-5.
25. *Park S, Chung H, Lee M*. Clinical and microbiological characteristics of six *Staphylococcus pettenkoferi* isolates from blood samples. Ann Lab Med 2015; 35: 250-3.
26. *Rossi CC, da Silva Dias I, Muniz IM*, i inni. The oral microbiota of domestic cats harbors a wide variety of *Staphylococcus* species with zoonotic potential. Vet Microbiol 2017; 201: 136-40.
27. *Savini V, Kosecka M, Siegwart E,* i inni. Daptomycin-resistant *Staphylococcus pettenkoferi* of human origin. Acta Biochim Pol 2016; 63: 297-301.
28. *Singer M, Deutschman CS, Seymour CW,* i inni. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016; 315: 801-10.
29. *Song SH, Park JS, Kwon HR,* i inni. Human bloodstream infection caused by *Staphylococcus pettenkoferi*. J Med Microbiol 2009; 58: 270-2.
30. *Staphylococcus pettenkoferi* B3117. BacDive, https://bacdive.dsmz.de/strain/14671 (Access 20.06.2021).
31. *Trülzsch K, Grabein B, Schumann P,* i inni. *Staphylococcus pettenkoferi* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 1543-8.
32. *Trülzsch K, Rinder H, Trcek J*, i inni. *Staphylococcus pettenkoferi*. a novel *staphylococcal* species isolated from clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43: 175-82.
33. *Vecchia M, Lombardi A, Zuccaro V*, i inni. A clinical case of sepsis due to *Staphylococcus pettenkoferi*. Infez Med 2018; 26: 369-73.
34. *Weiss S, Kadlec K, Fessler AT*, i inni. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. Vet Microbiol 2013; 167: 680-5.
35. *Xu Z, Shah HN, Misra R,* i inni. The prevalence, antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase negative staphylococci recovered from non-healthcare settings in London, UK. Antimicrob Resist Infect Control 2018; 7: 73.

Otrzymano: 2 VI 2021
Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
e-mail: marta.kierzkowska@wum.edu.pl, tel. (22) 622 00 28

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2021,73: 15-23 https://doi.org/10.32394/mdm.73.02

Ocena występowania genetycznych determinant warunkujących wielolekooporność wśród szczepów z gatunku *Acinetobacter baumannii*

Evaluation of the occurrence of genetic determinants of multi-drug resistance among *Acinetobacter baumannii* strains

Magdalena Wawrzyniak[1], Joanna Czekajewska[1], Maja Kosecka-Strojek[2], Paweł Nowak[1]*

[1]Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
[2]Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Badaniom poddano 30 wielolekoopornych szczepów *Acinetobacter baumannii*. Wykazano obecność genów $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ oraz $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ odpowiednio u 10% oraz 90% szczepów. Wśród wszystkich badanych szczepów potwierdzono występowanie genetycznych determinant dla pompy AdeABC, sekwencji insercyjnej (I*SAba1*) oraz genu związanego z produkcją biofilmu (*abaI*). Analiza pokrewieństwa badanych szczepów z użyciem metody RAPD-PCR wykazała ich zróżnicowane podobieństwo genetyczne.

Słowa kluczowe: *Acinetobacter baumannii, wielolekooporność, genotypowanie, RAPD-PCR, pompy efflux, sekwencje insercyjne, biofilm*

ABSTRACT

Introduction: The aim of the study was the analysis of occurrence of genetic determinants of multi-drug resistance and the assessment of genetic relationship among *Acinetobacter baumannii* strains.

Methods: Multiplex-PCR method was performed in order to: (1) confirm the phenotypic identification and (2) detect the presence of CHDL oxacillinases in the group of thirty *A. baumannii* strains. Further PCR studies included the analysis of the occurrence of genetic determinants associated with efflux pump, insertion sequence and biofilm formation. The relationship between bacterial strains was assayed using 6 primers in RAPD-PCR method.

Results: Detection of the $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ gene confirmed that the strains belong to the *A. baumannii* species. In the multiplex-PCR, the presence of the $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ and $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ genes was detected in 3 (10%) and 27 (90%) isolates, respectively. Moreover, some strains showed the coexistence of the $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ and $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ genes (10%, n=3) or

* Autor korespondujący

bla$_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ and *bla*$_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ (90%, n=27). In the group of analysed strains the presence of the efflux pump gene (adeA) and the insertion sequence IS*Aba1* were demonstrated in all tested isolates. Biofilm-related genes (*abaI, csuE*) were found in 100% and 97% (n=29) tested strains adequately. The RAPD-PCR studies revealed the presence of 10 unrelated genotypes.

Conclusions: The obtained results suggest that the phenomenon of multi-drug resistance in the studied *A. baumannii* strains could be attributed to the occurrence of CHDL oxacillinases, AdeABC efflux pump, insertion sequence IS*Aba1* and the biofilm formation.

Key words: *Acinetobacter baumannii, multi-drug resistance, genotyping, RAPD-PCR, efflux pump, insertion sequence, biofilm*

WSTĘP

Bakterie z gatunku *A. baumannii* charakteryzują się dużą opornością na działanie środków dezynfekcyjnych, promieniowania UV, a także zdolnością do tworzenia biofilmu. Wymienione wyżej cechy predysponują szczepy z tego gatunku do przetrwania i rozprzestrzeniania się w niekorzystnych warunkach środowiskowych (m.in. w środowisku szpitalnym). W warunkach szpitalnych patogen ten może zasiedlać wilgotne przestrzenie – krany, prysznice, ujścia zlewów, w konsekwencji będąc przyczyną kontaminacji aparatury medycznej oraz kolonizacji naskórka pracowników placówek medycznych. Może to stanowić źródło szerzenia się zakażeń szpitalnych o etiologii *A. baumannii* wśród pacjentów hospitalizowanych w danej jednostce opieki medycznej (1,20).

Zakażenia o etiologii *A. baumannii* stanowią wyzwanie terapeutyczne ze względu na dużą naturalną oporność, jak i dużą zdolność do nabywania oporności na leki (9). W raporcie CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*) dotyczącym zagrożeń związanych z antybiotykooopornością w Stanach Zjednoczonych („*Antibiotic Resistance Threats in the United States*") gatunek *A. baumannii* oporny na karbapenemy umieszczono na pierwszym miejscu wśród lekoopornych drobnoustrojów, stanowiących obecnie największe zagrożenie (6). Spośród wielu współwystępujących u *A. baumannii* czynników odgrywających ważną rolę w zjawisku lekooporności do najbardziej istotnych klinicznie należą: (1) produkcja beta-laktamaz; (2) obecność pomp aktywnego wyrzutu leków; (3) występowanie sekwencji insercyjnych (pełniących rolę promotora dla genów warunkujących oporność) oraz (4) zdolność do wytwarzania biofilmu (4, 10, 21). Szczepy z gatunku *A. baumannii* mogą pozyskać oporność na penicyliny i karbapenemy poprzez nabycie genów *bla*$_{OXA}$ kodujących beta-laktamazy szczególnie w przypadku ich współwystępowania z sekwencjami insercyjnymi lub przy jednoczesnej nadekspresji pomp aktywnego wyrzutu leków (3, 21). Operon *adeABC* koduje jeden z systemów pomp aktywnego wyrzutu leków u szczepów z gatunku *A. baumannii*. Nadekspresja tego operonu warunkowana jest m. in. poprzez poprzedzenie jego sekwencji sekwencją insercyjną IS*Aba1* i może skutkować wykształceniem oporności na wiele grup leków przeciwdrobnoustrojowych (21). Obecność szczepów *A. baumannii* tworzących biofilm na powierzchni sprzętu medycznego może być jedną z przyczyn zakażeń szpitalnych związanych z wy-

korzystaniem biomateriałów w lecznictwie (20). Ze względu na swoją wysoką oporność na leki, *A. baumannii* pozostaje jednym z najistotniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych – odrespiratorowego zapalenia płuc, zakażeń krwi związanych z linią centralną, zakażeń dróg moczowych oraz zakażeń ran (8).

Jednym z istotnych elementów strategii związanych z wykrywaniem, zapobieganiem oraz zwalczaniem zakażeń szpitalnych jest określenie stopnia pokrewieństwa szczepów bakteryjnych, izolowanych od pacjentów danej placówki ochrony zdrowia. Zastosowanie badań molekularnych umożliwia wykrycie klonów epidemicznych, ustalenie ich źródła i dróg szerzenia się, a także określenie obszaru, na którym występują. Narastająca lekooporność bakterii czyni typowanie szczepów coraz ważniejszym zadaniem w dochodzeniach epidemiologicznych. Do najistotniejszych metod genotypowania szczepów bakteryjnych należą: REA-PFGE (ang. *Restriction Enzyme Analysis – Pulsed Field Gel Electrophoresis*), AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism*), RAPD-PCR (ang. *Random Amplification of Polymorphic DNA*), MLVA (ang. *Multi Locus VNTR Analysis*), mikromacierze oraz metody oparte na technologii sekwencjonowania, w tym sekwencjonowania nowej generacji (5).

Celem niniejszej pracy była ocena współwystępowania genetycznych determinant wielolekooporności (*bla*$_{OXA}$, *adeA,* IS*Aba1*, *abaI, csuE*) oraz analiza stopnia pokrewieństwa wśród klinicznych szczepów z gatunku *Acinetobacter baumannii*.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Materiał stanowiło 30 wielolekoopornych szczepów klinicznych z gatunku *A. baumannii* wyizolowanych w 2017 roku od pacjentów hospitalizowanych w różnych oddziałach Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Wykorzystane w badaniach izolaty zostały zidentyfikowane oraz określono dla nich lekowrażliwość z zastosowaniem systemu automatycznego VITEK 2 (bioMerieux) w ramach rutynowej pracy Zakładu Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Wszystkie badane szczepy charakteryzowały się opornością wobec leków z grup: penicylin (piperacylina, piperacylina/tazobaktam), cefalosporyn III i IV generacji (ceftazydym, cefepim), karbapenemów (imipenem, meropenem) oraz fluorochinolonów (ciprofloksacyna, lewofloksacyna). Stwierdzono również wysoki odsetek szczepów opornych na aminoglikozydy (amikacyna – 80%, n=24; gentamycyna – 63%, n=19; tobramycyna – 77%, n=23; netylmycyna – 87%, n=26). Zdecydowana większość szczepów (93%, n=28) cechowała się natomiast wrażliwością na kolistynę. Wybrane do badań szczepy *A. baumannii* były przechowywane w temperaturze -80°C z zastosowaniem systemu Microorganism Preservation System - Protect (TSC Technical Service Consultants Ltd).

Genetyczna identyfikacja gatunku oraz wykrywanie obecności genów nabytych oksacylinaz metodą multiplex-PCR. Procedurę izolacji genomowego DNA badanych izolatów przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology), zgodnie ze zmodyfikowaną metodyką producenta. W reakcji multipleks-PCR dokonano identyfikacji gatunkowej, poprzez potwierdzenie obecności genu spokrewnionego z *bla*$_{OXA\text{-}51\text{-}like}$, a także wykrycia obecności genów wybranych nabytych oksacylinaz: *bla*$_{OXA\text{-}23\text{-}like}$, *bla*$_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ oraz *bla*$_{OXA\text{-}58\text{-}like}$. Powyższą reakcję przeprowadzano w oparciu

o zmodyfikowaną metodykę opisaną przez *Woodforda* i wsp. [25]. Dokonano oceny obecności oraz wielkości produktów amplifikacji przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym barwionym roztworem bromku etydyny. Wielkość produktów porównywano wobec markerów wielkości DNA Thermo Fisher Scientific GeneRuler DNA Ladder (50 pz i 100 pz). Dokonano wizualizacji produktów reakcji PCR w świetle UV.

Wykrywanie obecności pozostałych genetycznych determinant oporności oraz genów związanych z produkcją biofilmu. W badanej grupie szczepów przeprowadzono 4 niezależne reakcje PCR celem wykrycia genu strukturalnego pompy wyrzutu leków AdeABC (*adeA*) (15), fragmentu sekwencji insercyjnej IS*Aba1* (22) oraz genów związanych z produkcją biofilmu – *csuE* i *abaI* (16). Reakcje PCR przeprowadzano przy zastosowaniu starterów opisanych przez odpowiednio *Li* i wsp, *Segal* i wsp. oraz *Liu* i wsp. Rozdział oraz wizualizację produktów reakcji PCR przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną powyżej dla reakcji multipleks-PCR.

Ocena stopnia pokrewieństwa badanych szczepów. Przeprowadzono 6 oddzielnych reakcji RAPD-PCR w odpowiednich warunkach amplifikacji z wykorzystaniem starterów: 208, 272 (17), 1247 (19), ERIC-2 (24), M13 (23), PAL-2 (18) o sekwencjach opisanych przez odpowiednio *Mahenthiralingam* i wsp., *Mathis* i wsp., *Yang* i wsp., *Ravi* i wsp. oraz *Matar* i wsp. Po zakończeniu reakcji amplifikacji dokonywano rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji w 2% żelu agarozowym barwionym roztworem bromku etydyny. Wielkość produktów porównywano wobec markerów wielkości A&A Biotechnology DNA Marker 3 (100-3000 pz) oraz Thermo Fisher Scientific GeneRuler DNA Ladder (100 pz). Produkty reakcji PCR uwidoczniono w świetle UV i sfotografowano.

Uzyskane produkty amplifikacji analizowano przy użyciu oprogramowania Gel Compare II (Applied Maths) z wykorzystaniem analizy skupień metodą średnich połączeń (UPGMA, ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean*). Dokonano zbiorczej analizy prążków otrzymanych po elektroforezie dla poszczególnych szczepów, uwzględniając wszystkie 6 starterów. Szczepy o 100% homologii uznano za nierozróżnialne pod względem genetycznym w metodzie RAPD-PCR. Podobieństwo w zakresie 99-80% wyznaczało szczepy o bardzo bliskim stopniu pokrewieństwa, a szczepy o homologii na poziomie 79-50% klasyfikowano jako spokrewnione w umiarkowanym stopniu. Natomiast za szczepy ze sobą niespokrewnione uznano te, które wykazywały mniej niż 50% homologii.

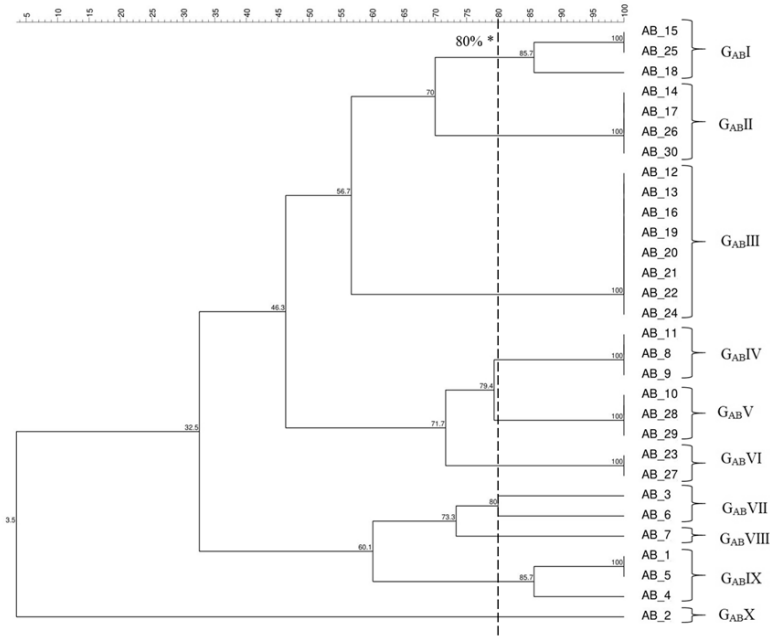
WYNIKI

W niniejszej pracy poddano badaniom 30 wielolekoopornych szczepów z gatunku *A. baumannii*, pochodzących z różnych oddziałów Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Przynależność do gatunku potwierdzono u wszystkich izolatów (100%, n=30) poprzez wykrycie genów spokrewnionych z $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ w reakcji multipleks-PCR. Ponadto, z zastosowaniem powyższej reakcji amplifikacji dokonano także analizy obecności wybranych genetycznych determinant nabytych karbapenemaz z grupy OXA. Wykazano występowanie genów spokrewnionych z $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ oraz $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ u odpowiednio 27 (90%) oraz 3 (10%) szczepów. Gen spokrewniony z $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ nie został wykryty u żadnego ze szczepów. U wybranych szczepów geny spokrewnione z $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ oraz $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ (90%,

n=27) lub $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ oraz $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ (10%, n=3) występowały jednocześnie. Żaden z badanych szczepów nie wykazał współwystępowania trzech wyżej wymienionych genów.

Kolejnym etapem badań była ocena obecności genetycznych determinant oporności. Wśród wszystkich szczepów poddanych badaniom gen *adeA*, będący składową operonu *adeABC*, który koduje pompę wyrzutu leków z rodziny RND oraz sekwencja insercyjna IS*Aba*1, której występowanie może powodować nadekspresję genów związanych z lekoopornością zostały wykryte u wszystkich badanych szczepów. Podobnie geny związane z produkcją biofilmu, reprezentowane przez *abaI*, kodujący syntazę autoinduktora oraz *csuE*, kodujący białka fimbrii, wykryto odpowiednio u 100% oraz 97% (n=29) analizowanych szczepów.

W dalszej kolejności dokonano genetycznej oceny stopnia pokrewieństwa analizowanych szczepów, przeprowadzonej przy pomocy szeregu reakcji RAPD-PCR oraz zbiorczej analizy uzyskanych wzorów prążkowych. Wykazano obecność 10 różnych genotypów. W obrębie tych genotypów szczepy były nierozróżnialne pod względem genetycznym lub o bardzo bliskim stopniu pokrewieństwa w metodzie RAPD-PCR (homologia w zakresie 80-100%). Natomiast pomiędzy genotypami szczepy wykazywały umiarkowany stopień podobieństwa genetycznego lub nie były spokrewnione – ich homologia wynosiła mniej niż 80%. Zestawienie szczepów z uwzględnieniem stopnia homologii w ramach danego genotypu oraz pomiędzy nimi przedstawiono w formie dendrogramu (drzewa pokrewieństwa) na Ryc. 1.



Ryc. 1 Dendrogram zbiorczy, przedstawiający stopień pokrewieństwa 30 badanych szczepów *A. baumannii* w metodzie RAPD-PCR (Gel Compare II, UPGMA).
G_{AB}I – genotyp pierwszy, G_{AB}II – genotyp drugi, G_{AB}III – genotyp trzeci, G_{AB}IV – genotyp czwarty, G_{AB}V – genotyp piąty, G_{AB}VI – genotyp szósty, G_{AB}VII – genotyp siódmy,

G_{AB}VIII – genotyp ósmy, G_{AB}IX – genotyp dziewiąty, G_{AB}X – genotyp dziesiąty.
* linią przerywaną zaznaczono wartość odcięcia dla wyznaczenia genotypów, stanowiącą 80%

DYSKUSJA

Acinetobacter baumannii to jeden z najistotniejszych czynników etiologicznych infekcji związanych z opieką medyczną. Narastający problem zakażeń szpitalnych stanowi obecnie wyzwanie dla współczesnej medycyny.

W badaniach własnych w grupie 30 wielolekoopornych izolatów klinicznych, pochodzących od pacjentów z różnych oddziałów Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, potwierdzono przynależność do gatunku *A. baumannii* wykrywając gen spokrewniony z $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ u wszystkich szczepów. Następnie dokonano analizy obecności genów trzech nabytych oksacylinaz. Geny spokrewnione z $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ oraz $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ wykryto u odpowiednio 27 (90%) oraz 3 (10%) szczepów. Natomiast u żadnego ze szczepów nie wykazano obecności genu spokrewnionego z $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$. W badaniach *Kuo* i wsp. wykryto geny spokrewnione z $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ u 52,6%, z $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ u 10,6%, a z $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ u 1,1% badanych szczepów *A. baumannii* (n=555). Szczepy te wyizolowane były od pacjentów leczonych w 26 szpitalach z 4 regionów Tajwanu (12). Z kolei w pracy *Leungtongkam* i wsp. badano obecność genów spokrewnionych z $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$, $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ oraz $bla_{OXA\text{-}40\text{-}like}$ i wykazano ich obecność u odpowiednio 82,6%, 6,5% oraz 0,3% szczepów w badanej grupie. W cytowanej pracy analizom poddano izolaty (n=339) pochodzące z oddziałów szpitalnych jednostek opieki medycznej w Tajlandii (14). Różnice w częstości występowania genetycznych determinant nabytych karbapenemaz z grupy OXA wśród badanych szczepów w poszczególnych pracach mogą wynikać z: różnic w ich pokrewieństwie, zróżnicowania pod kątem charakterystyki szpitali i oddziałów, z których pochodzą, a także lokalnej sytuacji epidemiologicznej oraz częstości występowania zakażeń o etiologii *A. baumannii.*

W badaniach własnych analizowano również występowanie genów związanych z pompą wyrzutu leków, sekwencją insercyjną oraz produkcją biofilmu u szczepów z gatunku *A. baumannii*.

Obecność genu *adeA*, kodującego jedną ze składowych pompy aktywnego wyrzutu leków, wykazano u wszystkich (100%) badanych wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*. Szacuje się, że operon *adeABC* występuje średnio u 53-97% izolatów, biorąc pod uwagę globalną populację szczepów z tego gatunku (7). W pracy *Coyne* i wsp. wykazano największą zależność pomiędzy występowaniem oporności wielolekowej, a wykryciem obecności genu *adeA* (7).

W niniejszej pracy sekwencję insercyjną IS*Aba1*, której występowanie może powodować nadekspresję genów związanych z lekoopornością np. operonu *adeABC*, wykryto u wszystkich (100%) badanych szczepów *A. baumannii*. Podobnie w badaniach Kobs i wsp. wszystkie badane szczepy *A. baumannii* (n=78), wyizolowane od pacjentów z jednego szpitala w południowej Brazylii, posiadały element IS*Aba*1 (13).

W badaniach własnych wykryto także obecność genów związanych z produkcją biofilmu – genu *abaI*, kodującego syntazę autoinduktora oraz genu *csuE*, kodującego białka fimbrii. Obecność tych genów wykazano odpowiednio u 100% oraz 97% (n=29) analizowanych szczepów *A. baumannii*. W pracy *Azizi* i wsp. wśród szczepów MDR *A. baumannii* (n=65), pochodzących od pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej

terapii dwóch irańskich szpitali, sprawdzano obecność genów związanych z produkcją biofilmu. Gen *csuE* był obecny u wszystkich szczepów (100%) poddanych analizie (3). Z kolei w badaniach *Liu* i wsp. poszukiwano m.in. genów *abaI* oraz *csuE*. Geny te wykryto u 59,8% (73/122) badanych wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*, wyizolowanych z materiałów klinicznych pochodzących z infekcji dolnych dróg oddechowych w szpitalu w Chinach (16).

W kontekście zakażeń szpitalnych szczególnie niebezpieczne jest klonalne szerzenie się drobnoustrojów, zwłaszcza szczepów cechujących się wielolekoopornością. Typowanie drobnoustrojów odgrywa istotną rolę w epidemiologii, stanowi bowiem pomocne narzędzie w profilaktyce i monitorowaniu zakażeń szpitalnych. W badaniach własnych w grupie 30 szczepów z gatunku *A. baumannii* dokonano oceny stopnia pokrewieństwa stosując metodę RAPD-PCR oraz 6 starterów. Jako punkt odcięcia dla wyznaczenia genotypów przyjęto wartość 80%. Zbiorcza analiza uwzględniająca wszystkie użyte w badaniu startery pozwoliła na wykazanie obecności 10 genotypów (G_{AB}I-G_{AB}X). W obrębie genotypu G_{AB}III zgromadzonych zostało najwięcej szczepów (n=8). Największa konserwatywność pod względem oddziału szpitalnego, z którego izolowane były szczepy, cechowała przedstawicieli genotypu G_{AB}III – 7 z 8 (87,5%) szczepów pochodziło z Oddziału Intensywnej Terapii. Natomiast genotypy G_{AB}I oraz G_{AB}IV były pod tym kątem najbardziej zróżnicowane – każdy ze szczepów w obrębie danego genotypu pochodził z innego oddziału szpitalnego. Ze względu na niskie koszty i łatwość wykonania metoda RAPD-PCR znajduje zastosowanie w genetycznym różnicowaniu wielu gatunków mikroorganizmów, w tym także jednego z najistotniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych – *A. baumannii* (2). W badaniach *Karthika* i wsp. przeprowadzonych w grupie 48 szczepów *A. baumannii*, pochodzących od pacjentów leczonych w różnych oddziałach jednego ze szpitali uniwersyteckich w Egipcie, wyodrębniono 6 genotypów wykorzystując metodę RAPD-PCR (11). Różnice w stopniu pokrewieństwa badanych szczepów oraz w liczbie wyodrębnionych genotypów mogą wynikać ze zróżnicowania pod kątem liczby i charakterystyki szpitali oraz oddziałów, z których pochodzą izolaty w poszczególnych pracach, a także częstości występowania zakażeń powodowanych przez *A. baumannii*. Wpływ na uzyskane wyniki mogą mieć również lokalna sytuacja epidemiologiczna oraz szpitalne strategie dotyczące profilaktyki i zwalczania zakażeń szpitalnych. Wprowadzenie do rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej metod biologii molekularnej może przyczynić się do ograniczenia zjawiska zakażeń szpitalnych zarówno w kontekście szybkiej identyfikacji, określenia lekooporności, czynników wirulencji, jak i typowania epidemiologicznego.

PODSUMOWANIE

Za zjawisko wielolekooporności w grupie badanych szczepów *A. baumannii* mogą być odpowiedzialne: oksacylinazy CHDL, pompa wyrzutu leków AdeABC, obecność sekwencji insercyjnej IS*Aba1* oraz zdolność do produkcji biofilmu.

Badane szczepy wykazywały zróżnicowane podobieństwo genetyczne względem siebie. Pomimo wyodrębnienia 10 genotypów, wynikających z różnic w pokrewieństwie w metodzie RAPD-PCR, wyżej wymienione determinanty genetyczne występowały powszechnie w badanej grupie szczepów.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękujemy Pani dr Jolancie Kędzierskiej z Zakładu Mikrobiologii, Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie za udostępnienie kolekcji wybranych szczepów bakteryjnych.

Serdecznie dziękujemy Panu prof. dr hab. Jackowi Międzobrodzkiemu z Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego za możliwość skorzystania z oprogramowania komputerowego – Gel Compare II (Applied Maths).

PIŚMIENNICTWO

1. *Antunes LCS, Visca P, Towner KJ.* Acinetobacter baumannii: Evolution of a global pathogen. Pathog. Dis 2014; 71: 292–301.
2. *Asadian M, Azimi L, Alinejad F* i inni. Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Isolated from VentilatorAssociated Pneumonia and Burn Wound Colonization by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction and the Relationship between Antibiotic Susceptibility and Biofilm. Adv Biomed Res 2019; 6: 1–13.
3. *Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H* i inni. Molecular Analysis and Expression of bap Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Reports Biochem Mol Biol 2016; 5: 62–72.
4. *Bogiel T, J. Kwiecińska-Piróg J, Jachna-Sawicka K, Gospodarek E*. Szczepy *Acinetobacter baumannii* oporne na karbapenemy. Med Dosw Mikrobiol 2010. 62: 119–26.
5. *Brzozowski M, Kwiatkowski P, Kosik-Bogacka D, Jursa-Kulesza J.* Metody genotypowe i fenotypowe wykorzystywane w typowaniu drobnoustrojów do celów epidemiologicznych. Postep Mikrobiol 2017; 56: 353–66.
6. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services, CDC Atlanta, GA 2019.
7. *Coyne S, Courvalin P, Périchon B*. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 947–53.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. ECDC Stockholm 2019.
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST: Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes version 3.2. EUCAST 2020.
10. *Jachna-Sawicka K, Wójcik W, Gospodarek E*. Ocena wybranych właściwości morfologicznych wariantów pałeczek *Acinetobacter baumannii* complex. Med Dosw Mikrobiol 2013; 65: 93–101.
11. *Karthika RU, Rao RS, Sahoo S* i inni. Phenotypic and genotypic assays for detecting the prevalence of metallo-β-lactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a South Indian tertiary care hospital. J Med Microbiol 2009; 58: 430–5.
12. *Kuo SC, Huang WC, Huang TW* i inni. Molecular epidemiology of emerging $bla_{OXA\text{-}23\text{-}Like}$ - and $bla_{OXA\text{-}24\text{-}Like}$ - carrying *Acinetobacter baumannii* in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62: 1–9.

13. *Kobs VC, Ferreira JA, Bobrowicz TA* i inni. The role of the genetic elements bla_{oxa} and ISAba1 in the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. Rev Soc Bras Med Trop 2016; 49: 433–40.
14. *Leungtongkam U, Thummeepak R, Wongprachan S* i inni. Dissemination of bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-58}, and bla_{NDM-1} Genes of *Acinetobacter baumannii* Isolates from Four Tertiary Hospitals in Thailand. Microb Drug Resist 2018; 24: 55–62.
15. *Li S, Duan X, Peng Y, Rui Y.* Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from clinical infection samples and fecal survey samples in Southern China. BMC Infect Dis 2019; 19: 1–12.
16. *Liu H, Wu YQ, Chen LP* i inni. Biofilm-related genes: Analyses in multi-antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from mainland China. Med Sci Monit 2016; 22: 1801–7.
17. *Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J* i inni. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 1129-35.
18. *Matar GM, Harakeh HS, Ramlawi F* i inni. Comperative analysis between *Pseudomonas aeruginosa* genotypes and severity of symptoms in patients with unilateral or bilateral otitis externa. Curr Microbiol 2001; 42: 190–3.
19. *Mathis DL, Berghaus RD, Lee MD, Maurer JJ.* Variation in *Salmonella Enteritidis* RAPD-PCR Patterns May Not Be Due to Genetic Differences. Avian Dis 2011; 55: 620–5.
20. *McConnell MJ, Actis L, Pachón J. Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2012; 37: 130–55.
21. *Namysłowska A, Laudy AE, Tyski S*. Mechanizmy oporności *Acinetobacter baumannii* na związki przeciwbakteryjne. Postępy Mikrobiol 2015; 54: 392–406.
22. *Segal H, Garny S, Elisha BG*. Is IS_{ABA-1} customized for *Acinetobacter*? FEMS Microbiol Lett 2005; 243: 425–9.
23. *Ravi NS, Anandan S, Vijayakumar S* i inni. The potential of different molecular biology methods in tracking clones of acinetobacter baumannii in an ICU setting. J Med Microbiol 2018; 67: 1340–7.
24. *Yang L, Han L, Sun J* i inni. The molecular epidemiological study of colistin-only-sensitive strains in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Front Med China 2007; 1: 423–8.
25. *Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM* i inni. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 351–3.

Otrzymano: 22 IX 2021 r.
Adres Autora: 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2021,73: 25-37 https://doi.org/10.32394/mdm.73.03

Ocena przydatności szybkich, kasetkowych testów immunochromatograficznych w serologicznej diagnostyce COVID-19

Evaluation of rapid, cassette immunochromatographic tests in the serological diagnosis of COVID-19

Waldemar Rastawicki, Klaudia Płaza, Adam Pietrusiński

[1]Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oceniono przydatność siedmiu kasetkowych testów immunochromatograficznych w serodiagnostyce COVID-19. Do badań wykorzystano 107 próbek surowicy uzyskanych od 74 osób z aktualnym zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 potwierdzonym badaniem metodą RT-PCR. Największy odsetek wyników dodatnich uzyskano podczas poszukiwania przeciwciał klasy IgG zestawem NOVAtest (40,6%) oraz DIAGNOSIS (39,2%). Wykrywalność w przypadku zastosowania zestawu VAZYME wynosiła 36,4%, zestawu BIOSENSOR - 35,0%, zestawu ACCU-TELL - 31,3%, zestawu INGEZIM (IgA/G/M) - 30,0% oraz zestawu firmy PCL - 25,5%. Wykrywalność przeciwciał klasy IgM we wszystkich zestawach była znacznie niższa niż przeciwciał klasy IgG. Najwyższą czułością w klasie IgG, w stosunku do zestawu ELISA firmy Euroimmun, charakteryzował się zestaw firmy DIAGNOSIS (64,5%), najniższą zaś zestaw firmy PCL (38,7%). Swoistość wszystkich testów immunochromatograficznych była bardzo wysoka.

Słowa kluczowe: *testy immunochromatograficzne, SARS-CoV-2, COVID-19, serodiagnostyka, przeciwciała*

ABSTRACT

Introduction: Lateral flow assays (LFIA) are the technology behind low-cost, simple, rapid and portable detection devices popular in biomedicine. Lately, they are very common used in serodiagnosis of SARS-CoV-2 infections. The aim of the presented study was to assess the usefulness of selected LFIA in serological diagnosis of COVID-19.

Methods: The usefulness of seven lateral flow assays in the serodiagnosis of COVID-19 was evaluated (VAZYME, DIAGNOSIS, PCL, INGEZIM, BIOSENSOR, ACCU-TELL,

Praca wykonana w ramach realizacji planu naukowego nr BB-3/2021 NIZP-PZH na rok 2021

NOVAtest). The study used 107 serum samples obtained from 74 individuals with current SARS-CoV-2 infection confirmed by RT-PCR. The ELISA-IgG (Euroimmun) was used as the reference assay for sensitivity and specificity testing.

Results: The highest percentage of positive results was obtained when searching for IgG antibodies with the NOVAtest (40.6%) and DIAGNOSIS (39.2%) sets and the lowest detection for the PCL set - 25.5%. In the case of searching for IgM antibodies in all sets, significantly lower percentages of positive results compared to the IgG class were recorded. In general, all lateral flow assays showed low sensitivity in relation to the Euroimmun ELISA-IgG. The DIAGNOSIS kit (64.5%) was characterized by the highest sensitivity, and the PCL kit was the lowest (38.7%). On the other hand, the specificity of all kits was very high, almost 100% in almost all cases.

Conclusions: Lateral flow assays due to their low sensitivity are not suitable for quick diagnosis of the current SARS-CoV-2 infections and cannot be an alternative to genetic or even antigen tests. They may be used only to retrospectively test the presence of IgG antibodies. However, a negative results of LFIA in suspected disease or after vaccination should be confirmed by more sensitive serological tests.

Key words: *Lateral-Flow Immunochromatographic Assay, SARS-CoV-2, COVID-19, serodiagnosis, antibodies*

WSTĘP

W serodiagnostyce COVID-19 można wykorzystywać różne metody diagnostyczne, pozwalające na wykrycie swoistych przeciwciał wytworzonych przez organizm człowieka po kontakcie z antygenami wirusa (4,7,10). Przydatność testów serologicznych wykrywających przeciwciała w diagnostyce COVID-19 uwarunkowana jest jednak dynamiką pojawiania się odpowiedzi humoralnej. Wykrycie diagnostycznego poziomu swoistych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 klasy IgM jest możliwe najwcześniej po około 7-10 dniach od momentu wystąpienia pierwszych objawów klinicznych zakażenia, natomiast przeciwciał klasy IgG jeszcze później (9,11). Dodatkowo, trzeba pamiętać także o dużych różnicach osobniczych, związanych z intensywnością przebiegu choroby oraz stanem układu immunologicznego, a także o ograniczonej swoistości testów serologicznych (1).

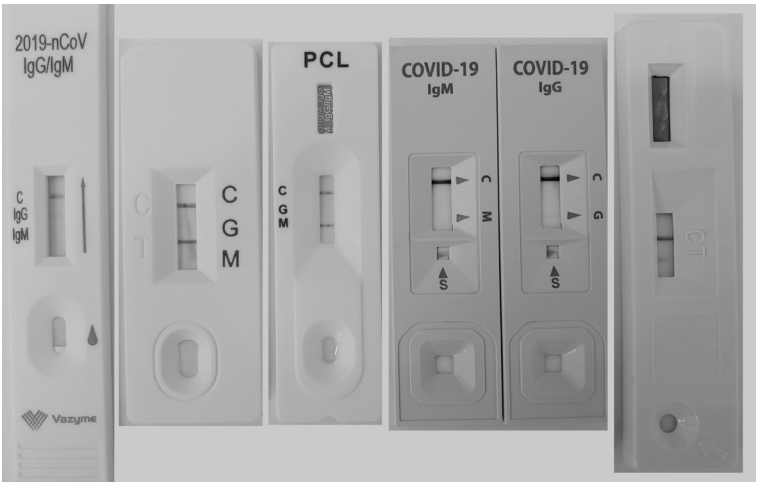
Wiele spośród dostępnych na rynku komercyjnych testów służących do serodiagnostyki COVID-19 to tzw. szybkie testy „kasetkowe" oparte na technice immunochromatografii z przepływem bocznym (lateral-flow, LFIA). Zasada działania tych testów polega na reakcji obecnych w próbce surowicy, osocza bądź pełnej krwi przeciwciał ze znakowanymi, np. cząsteczkami złota, antygenami wirusa. Powstały kompleks migruje przez membranę nitrocelulozową pod wpływem działania sił kapilarnych i jest ostatecznie wychwytywany przez przyczepione na membranie przeciwciała dla ludzkich immunoglobulin, tworząc czerwoną linię. Zaletą tych testów jest prostota wykonania (nie są potrzebne żadne dodatkowe odczynniki czy też wyposażenie do odczytu wyniku) oraz bardzo krótki czas uzyskania wyniku (zazwyczaj 10-15 minut). O wyniku dodatnim świadczy pojawienie się linii testowych oraz linii kontrolnej. W przypadku braku linii kontrolnej badanie należy powtórzyć (12,13). Badania te mogą być wykonane w każdym ambulato-

rium szpitalnym czy nawet w warunkach terenowych. Ze względu na dostępność, prostotę wykonania i szybkość uzyskania wyniku testy kasetkowe cieszą się dużą popularnością. Nie mniej jednak, w przypadku niektórych testów, dostępne są jedynie dane producenta, określające zazwyczaj na bardzo wysokim poziomie, czułość i swoistość diagnostyczną wyprodukowanych zestawów. Tak więc, szybkie testy, przed wprowadzeniem do rutynowej diagnostyki w danym kraju, powinny zostać wcześniej zwalidowane (9).

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności wybranych kasetkowych testów immunochromatograficznych w serologicznej diagnostyce COVID-19

MATERIAŁ I METODY

1. Badane próbki surowicy. Próbki surowicy uzyskano od 74 osób z COVID-19 z zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 potwierdzonym badaniem metodą RT-PCR. Od 33 osób uzyskano po dwie próbki surowicy w odstępie kilku-kilkunastu dni. Łącznie do badań wykorzystano 107 próbek surowicy, z tym, że liczba badanych próbek w poszczególnych zestawach była różna (Tabela 1.). Dodatkowo, w celu oceny swoistości zestawu firmy VAZYME, wykorzystano 69 próbek surowicy uzyskanych przed epidemią SARS-CoV-2 od osób z mykoplazmozą, krztuścem, legionellozą, jersiniozą i chlamydiozą.
2. Szybkie kasetkowe testy immunochromatograficzne. Wszystkie badania wykonywano zgodnie z instrukcjami producentów odczytując wynik po 10-15 minutach. W przeciwieństwie jednak do podanych instrukcji, w których we wszystkich zestawach przyjęto dwustopniową skalę oceny (brak prążka = wynik ujemny, obecność prążka = wynik dodatni) na potrzeby niniejszego badania rozszerzono skalę subiektywnej oceny intensywności prążka do czterech stopni („-" brak prążka = wynik ujemny, „+/-" = wynik wątpliwy, „+" = wynik słabo dodatni, „++" = wynik silnie dodatni). Na rycinie 1 przedstawiono przykładowe wyniki uzyskane w różnych testach kasetkowych.



Ryc.1. Przykładowe wyniki uzyskane w różnych, kasetkowych testach immunochromatograficznych.

W badaniach wykorzystano siedem testów immunochromatograficznych różnych producentów:

2.1. Test VAZYME - 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) IgG/IgM Detection Kit (Colloidal Gold-Based), Version3.0, nr kat. C6603C.
2.2. Test DIAGNOSIS – COVID-19 (SARS-CoV-2) IgM/IgG Antibody Test Kit, nr kat. SA-2-D.
2.3. Test PCL – PCL COVID19 IgG/IgM Rapid Gold, nr kat. COV03.
2.4. Test INGEZIM® COVID 19 CROM nr kat. 50.CoV.K41 firmy Ingenasa. Test wykrywa łącznie przeciwciała klasy IgA, IgG i IgM.
2.5. Test BIOSENSOR Standard Q COVID-19 IgM/IgG Duo nr ref. Q-NCOV-01D.
2.6. Test ACCU-TELL® COVID-19 IgG/IgM Cassette nr kat. ABT-IDT-B352 firmy AccuBiotech Co., Ltd.
2.7. Test NOVAtest® COVID-19 IgM/IgG Antibody test (Colloidal Gold) nr kat. nCov-497.

3. Test immunoenzymatyczny ELISA. Jako test referencyjny do oceny czułości i swoistości testów kasetkowych zastosowano zestaw ELISA IgG firmy Euroimmun nr kat. EI 2606-9601. W zestawie producent jako antygen zastosował białko S1 wirusa SARS-CoV-2.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli I przedstawiono wyniki oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi obecności przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19. Największy odsetek wyników dodatnich (ocenionych na + lub na ++) uzyskano podczas poszukiwania przeciwciał klasy IgG zestawem NOVAtest (40,6%) oraz DIAGNOSIS (39,2%). Wykrywalność przeciwciał klasy IgG w pozostałych testach była nieco niższa i wynosiła odpowiednio: w przypadku zastosowania zestawu VAZYME - 36,4%, zestawu BIOSENSOR - 35,0%, zestawu ACCU-TELL - 31,3%, zestawu INGEZIM (IgA/G/M) - 30,0% oraz zestawu firmy PCL - 25,5%. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgM we wszystkich zestawach zanotowano zdecydowanie niższe odsetki wyników dodatnich w porównaniu do klasy IgG. Najwyższy odsetek wyników dodatnich w klasie IgM występował podczas stosowania zestawu firmy NOVAtest (34,4%), najniższy zaś zestawu firmy BIOSENSOR (2,5%) oraz PCL (7,8%).

Trzeba mieć na uwadze, że w tabeli I przedstawiono tylko ogólną proporcję wyników ocenionych w czterostopniowej skali w poszczególnych zestawach. Na wynik badania serologicznego duży wpływ ma okres choroby w którym pobrano do badania próbkę surowicy. Swoiste przeciwciała pojawiają się zazwyczaj około 10 dni od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych COVID-19. Tak więc, zbyt wczesne pobranie krwi do badań serologicznych może skutkować fałszywie ujemnym wynikiem badania, zwłaszcza w klasie IgG. Z drugiej strony, w miarę upływu czasu, najszybciej obniża się poziom przeciwciał klasy IgM oraz IgA a w surowicy możemy wykryć jedynie przeciwciała klasy IgG. W prezentowanej pracy wykorzystano do badania próbki surowicy uzyskane od kilku do kilkunastu dni od początku objawów klinicznych COVID-19. Co więcej, nie we wszystkich ocenianych zestawach immunochromatograficznych do badania obecności

Tabela I. Wyniki oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi obecności przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19.

Test	Liczba próbek	Klasa Ig	Liczba (odsetek) próbek z wynikiem:			
			++	+	+/-	-
VAZYME	107	IgG	6 (5,6%)	33 (30,8%)	12 (11,2%)	56 (52,3%)
		IgM	2 (1,9%)	10 (9,3%)	5 (4,7%)	90 (84,1%)
DIAGNOSIS	51	IgG	11 (21,6%)	9 (17,6%)	6 (11,8%)	25 (49,0%)
		IgM	2 (3,9%)	12 (23,5%)	13 (25,5%)	24 (47,1%)
PCL	51	IgG	3 (5,9%)	10 (19,6%)	4 (7,8%)	34 (66,7%)
		IgM	1 (2,0)	3 (5,9%)	6 (11,8%)	41 (80,4%)
ACCU-TELL	32	IgG	5 (15,6%)	5 (15,6%)	3 (9,4%)	19 (59,4%)
		IgM	-	3 (9,4%)	11 (34,4%)	18 (56,3%)
NOVATEST	32	IgG	1 (3,1%)	12 (37,5%)	5 (15,6%)	14 (43,8%)
		IgM	1 (3,1%)	10 (31,3%)	5 (15,6%)	16 (50,0%)
BIOSENSOR	40	IgG	5 (12,5%)	9 (22,5%)	6 (15,0%)	20 (50,0%)
		IgM	-	1 (2,5%)	11 (27,5%)	28 (70,0%)
INGEZIM	30	IgA/G/M	4 (13,35)	5 (16,7%)	6 (20,0%)	15 (50,0%)

przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 wykorzystano dokładnie taką samą liczbę próbek surowicy uzyskanych od tych samych chorych. W takim układzie nie można porównywać wprost czułości diagnostycznej poszczególnych zestawów. Mając jednak na uwadze fakt, że jednym z najważniejszych parametrów testów diagnostycznych określających ich przydatność do rutynowych badań jest czułość i swoistość postanowiono porównać wyniki uzyskane w każdym zestawie immunochromatograficznym z wynikami odczynu ELISA firmy Euroimmun. Zestaw ELISA, oparty na białku S1 wirusa SARS-CoV-2, charakteryzujący się wysoką czułością i swoistością, potraktowano jako test odniesienia (test referencyjny). Ze względu na fakt, że wykrywalność przeciwciał klasy IgG w testach kasetkowych była dużo wyższa niż przeciwciał klasy IgM postanowiono określić czułość i swoistość wyłącznie dla tej klasy immunoglobulin.

Przeprowadzone badania wykazały niską czułość w stosunku do zestawu ELISA firmy Euroimmun wszystkich zestawów immunochromatograficznych (Tabela II). Najwyższą czułością charakteryzował się zestaw firmy DIAGNOSIS (64,5%), najniższą zaś zestaw firmy PCL (38,7%). Z drugiej strony swoistość wszystkich zestawów była bardzo wysoka, wynosząca w prawie wszystkich przypadkach 100%.

Wzajemne relacje wyników uzyskanych w poszczególnych zestawach immunochromatograficznych, osobno w klasie IgG i IgM, przedstawiono w tabelach III-IV. Przykładowo, warto zwrócić uwagę na porównanie wyników uzyskanych zestawem firmy DIAGNOSIS z wynikami uzyskanymi pozostałymi zestawami. W przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG zestawem VAZYME uzyskano 82,4% wyników zgodnych, zestawem firmy PCL 78,4%, zestawem firmy ACCU-TELL 84,4%, zestawem firmy NOVAtest 75,0%, zestawem firmy BIOSENSOR 80,0% i zestawem firmy INGEZIM 86,7% wyników zgodnych z zestawem DIAGNOSIS (Tabela III). W przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgM zestawem VAZYME uzyskano 72,5% wyników zgodnych, zesta-

Tabela II. Porównanie wyników oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi oraz testem ELISA firmy Euroimmun (test referencyjny) obecności przeciwciał klasy IgG dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19 (test INGEZIM klasy IgA/G/M).

Test kasetkowy	Klasa IgG	Odczyn ELISA Euroimmun IgG		Liczba (odsetek) wyników zgodnych	Czułość	Swoistość
		+	-			
VAZYME	+	35	1	68 (70,8%)	56,5%	97,1%
	-	27	33			
DIAGNOSIS	+	20	-	37 (77,1%)	64,5%	100%
	-	11	17			
PCL	+	12	-	30 (61,2%)	38,7%	100%
	-	19	18			
ACCU-TELL	+	10	-	19 (63,3%)	47,6%	100%
	-	11	9			
NOVATEST	+	12	-	21 (70,0%)	57,1%	100%
	-	9	9			
BIOSENSOR	+	13	-	26 (68,4%)	52,0%	100%
	-	12	13			
INGEZIM (IgA/IgM)	+	9	-	21 (75,0%)	56,3%	100%
	-	7	12			

wem firmy PCL 70,6%, zestawem firmy ACCU-TELL 71,9%, zestawem firmy NOVAtest 78,1%, zestawem firmy BIOSENSOR 80% i zestawem firmy INGEZIM 83,3% wyników zgodnych z zestawem DIAGNOSIS (Tabela IV).

W tabeli V przedstawiono wybrane wyniki uzyskane w poszczególnych zestawach immunochromatograficznych podczas badania próbek surowicy uzyskanych dwukrotnie od szpitalnych pacjentów chorych na COVID-19. W większości przypadków, badając pierwszą próbkę surowicy, uzyskaną zazwyczaj w ciągu kilku pierwszych dni od początku objawów klinicznych, uzyskano wynik ujemny zarówno w klasie IgG jak i IgM. W drugiej próbce surowicy, uzyskanej po 6 dniach od pierwszej, widać wyraźnie przyrost poziomu przeciwciał klasy IgG objawiający się w zestawach immunochromatograficznych jako prążek oceniany na plus (+) lub nawet dwa plusy (++). Na uwagę zasługuje fakt słabej wykrywalności w badanych próbkach surowicy przeciwciał klasy IgM. Najlepiej pod tym względem wypadły zestawy firmy NOVAtest oraz DIAGNOSIS, w których wykryto przeciwciała klasy IgM odpowiednio w 7 i 6 próbkach na 20 badanych. W pozostałych zestawach przeciwciała klasy IgM wykrywano sporadycznie. Częściej wynik interpretowany był jako wątpliwy, oceniany na +/-. Ciekawie wyglądają wyniki uzyskane podczas badania próbek surowicy uzyskanych od pacjenta z nr 10. W pierwszej próbce surowicy wynik dodatni, oceniony co więcej na dwa plusy, uzyskano tylko w zestawie firmy INGEZIM, wykrywającym wszystkie trzy klasy przeciwciał IgA, IgG i IgM. Jak

Tabela III. Porównanie wyników oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi obecności przeciwciał klasy IgG dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19 (test INGEZIM klasy IgA/G/M).

Test	Klasa IgM	VAZYME		DIAGNOSIS		PCL		ACCU-TELL		NOVATEST		BIOSENSOR		INGEZIM	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
VAZYME	+	X	X	14	3	11	6	7	5	11	2	8	2	8	3
	-	X	X	6	28	2	32	3	17	1	18	1	24	1	18
DIAGNOSIS	+	14	6	X	X	11	9	10	5	10	5	8	6	8	3
	-	3	28	X	X	2	29	-	17	3	14	1	20	1	18
PCL	+	11	2	11	2	X	X	6	2	7	1	6	1	6	2
	-	6	32	9	29	X	X	4	18	6	18	3	25	3	19
ACCU-TELL	+	7	3	10	-	6	4	X	X	6	4	5	5	5	3
	-	5	17	5	17	2	18	X	X	7	15	4	15	4	12
NOVATEST	+	11	2	10	3	7	6	6	7	X	X	9	2	8	3
	-	1	18	5	14	1	18	4	15	X	X	-	18	1	12
BIOSENSOR	+	8	1	8	1	6	3	5	4	9	-	X	X	7	1
	-	2	24	6	20	1	25	5	15	2	18	X	X	1	18
INGEZIM	+	8	1	8	1	6	3	5	4	8	1	7	1	X	X
	-	3	18	3	18	2	19	12	3	3	12	1	18	X	X

wykazały dalsze badania przeprowadzone odczynem ELISA, za wynik dodatni w zestawie INZGEZIM, odpowiedzialne były przeciwciała klasy IgA, obecne na wysokim poziomie w obydwu próbkach surowicy.

Ważnych informacji dostarczyła również analiza częstości występowania wyników dodatnich w zależności od okresu choroby pacjentów z COVID-19, w którym uzyskano próbki surowicy do badania (Tabela VI). Przeciwciała klasy IgG znacząco częściej wykrywano, wszystkimi ocenianymi testami, w próbkach surowicy uzyskanych po co najmniej tygodniu od początku objawów klinicznych. Co ciekawe, w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgM, uznawanej za pierwsze indukowane immunoglobuliny w przebiegu zakażenia, tylko w zestawie VAZYME wykrywano je częściej w próbkach surowicy uzyskanych w ostrej fazie choroby. W pozostałych testach, przeciwciała klasy IgM wyraźnie częściej wykrywano w próbkach surowicy uzyskanych po kolejnych kilku czy kilkunastu dniach trwania choroby.

Badanie swoistości diagnostycznej przy użyciu próbek surowicy uzyskanych od osób z grupy kontrolnej przeprowadzono tylko w przypadku zestawu immunochromatograficznego firmy VAZYME. Do tego celu wykorzystano łącznie 69 próbek surowicy osób z mykoplazmozą, krztuścem, legionellozą, jersiniozą czy też z chlamydiozą. Przeprowadzone badania wykazały obecność przeciwciał klasy IgM dla wirusa SARS-CoV-2 tylko w jednej próbce, natomiast przeciwciał klasy IgG w ani jednej próbce surowicy (odpowiednio swoistość 98,6% oraz 100%).

W dostępnym piśmiennictwie jest dużo opracowań dotyczących przydatności testów immunochromatograficznych w serodiagnostyce COVID-19. Poniżej przedstawiono tylko kilka wybranych.

Krone i wsp. (5) porównali wyniki uzyskane w trzech immunochromatograficznych testach serologicznych (Abbott PanBio COVID-19 IgG/IgM, Nadal COVID-19 IgG/IgM, Cleartest Corona 2019-nCOV IgG/IgM) z wynikami testu neutralizacji (PRNT50), który przyjęli za test odniesienia (złoty standard). Generalnie czułość wszystkich trzech testów była znacznie wyższa przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgG niż klasy IgM i wynosiła w przypadku testu Abbott odpowiednio 84,2% i 7,0%, w przypadku testu Nadal 86,0% i 66,7% oraz w przypadku testu Cleartest 89,5% i 21,1%. Swoistość testów Abbott i Nadal wynosiła 100%, natomiast testu Cleartest powyżej 90%. W badaniach autorów testy immunoenzymatyczne ELISA były czulsze niż szybkie testy kasetkowe.

de Almeida i wsp. (3) ocenili przydatność w serodiagnostyce COVID-19 czterech różnych testów immunochromatograficznych: MedTest IgG/IgM (MedLevensohn, Brazil), ECO Test IgG/IgM (Ecodiagnóstica, Brazil), Camtech Test IgM/IgG (Camtech Diagnostics Pte Ltd, Singapore) oraz Wondfo IgA/G/M (Biotech Co., China). Najwyższą czułością i swoistością w stosunku do testu RT-PCR charakteryzował się test Wondfo (odpowiednio 86,59% oraz 100%), najniższą zaś ECO Test (odpowiednio 81,71% oraz 78,38%). Według autorów szybkie testy immunochromatograficzne nie mogą zastąpić testów genetycznych, ale mogą być przydatne w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2.

W badaniach prowadzonych przez *Villarreal* i wsp. (12) wartość PPA (Positive Percent Agrement) testu immunochromatograficznego z testem RT-PCR podczas badania hospitalizowanych osób chorych na COVID-19 zależna była od czasu jaki upłynął od początku objawów klinicznych. Przypadku próbek uzyskanych w ciągu pierwszych 7 dni zgodność wynosiła 36,4%, w ciągu 8-14 dni 76,2% i powyżej 14 dni aż 87%.

Tabela IV. Porównanie wyników oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi obecności przeciwciał klasy IgM dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19 (test INGEZIM klasy IgA/G/M).

Test	Klasa IgM	VAZYME		DIAGNOSIS		PCL		ACCU-TELL		NOVATEST		BIOSENSOR		INGEZIM	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
VAZYME	+	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	X	X	14	37	5	32	1	18	2	16	1	34	7	19
DIAGNOSIS	+	-	14	X	X	4	10	2	8	7	3	1	7	6	2
	-	-	37	X	X	5	32	1	21	4	18	-	27	3	19
PCL	+	-	5	4	5	X	X	-	2	1	1	-	2	1	1
	-	-	32	10	32	X	X	3	29	10	18	1	33	3	17
ACCU-TELL	+	-	1	2	1	-	3	X	X	1	2	2	1	2	1
	-	-	18	8	21	2	29	X	X	5	19	1	25	5	14
NOVATEST	+	-	2	7	4	1	10	1	5	X	X	1	-	6	3
	-	-	16	3	18	1	18	2	19	X	X	8	20	3	12
BIOSENSOR	+	-	1	1	-	-	1	2	1	1	-	X	X	1	1
	-	-	34	7	27	2	33	1	25	8	20	X	X	8	19
INGEZIM	+	-	7	6	3	1	3	2	5	6	3	1	8	X	X
	-	-	19	2	19	1	17	1	14	3	12	-	19	X	X

Tabela V. Wyniki oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi obecności przeciwciał dla wirusa SARS--CoV-2 w próbkach surowicy uzyskanych dwukrotnie w odstępie 6 dni od 10 pacjentów szpitalnych chorych na COVID-19.

Pacjent	Próbka	VAZYME		DIAGNOSIS		PCL		ACCUTELL		NOVATEST		BIOSENSOR		INGEZIM
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgA/G/M
Nr1	1	+	-	-	+/-	+	-	-	-	+	+	++	+/-	-
	2	+	-	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+	++	+/-	+
Nr2	1	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-
	2	+	-	++	+	++	-	++	+/-	+	+	++	+	++
Nr3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+/-	+	+	+/-	+	-	+/-	+	+	+/-	+/-	++
Nr4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	BD
	2	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	+	-	BD
Nr5	1	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+/-	-	-	++	-	++	-	+/-	-	-	+/-	-	+/-
Nr6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-	+	-	+/-	+	+/-	+/-	-
Nr7	1	+	-	+	+	+	-	++	+/-	+	+	+	-	+
	2	+	-	++	+	++	+/-	++	+	+	+/-	+	-	+
Nr8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	++	-	+	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-
Nr9	1	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
	2	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Nr10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+/-	++
	2	+	-	+	+/-	-	-	-	-	+	+	++	+/-	++

Tabela VI. Wyniki oznaczania szybkimi, kasetkowymi testami immunochromatograficznymi obecności przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby od osób z COVID-19

Test	Liczba dni od początku objawów	Liczba próbek surowicy	Liczba (odsetek) próbek z wynikiem dodatnim	
			IgG	IgM
VAZYME	<7 dni	72	20 (27,8%)	10 (13,9%)
	>7 dni	35	19 (54,3%)	2 (5,7%)
DIAGNOSIS	<7 dni	25	5 (20,0%)	3 (12,0%)
	>7 dni	26	15 (57,7%)	11 (42,3%)
PCL	<7 dni	25	5 (20,0%)	-
	>7 dni	26	8 (30,8%)	4 (15,4%)
ACCU-TELL	<7 dni	16	3 (18,8%)	1 (6,3%)
	>7 dni	16	7 (43,8%)	2 (12,5%)
NOVATEST	<7 dni	16	3 (18,8%)	3 (18,8%)
	>7 dni	16	10 (62,5%)	8 (50,0%)
BIOSENSOR	<7 dni	19	4 (21,1%)	-
	>7 dni	22	11 (50,0%)	1 (4,5%)
INGEZIM	<7 dni	15	3 (20,0%)	
	>7 dni	15	6 (40,0%)	

Pecoraro i wsp. (8) w swoich badaniach wykorzystali dwa testy immunochromatograficzne: COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Prima Lab SA oraz Techno Genetics KHB Group—Shangai. Czułość testów u objawowych pacjentów z COVID-19 wynosiła odpowiednio 85,4% i 78,6%, a swoistość odpowiednio 89% i 94%. Autorzy konkludują, że można poszukiwać przy użyciu testów kasetkowych przeciwciał klasy IgG już 6 dni od początku objawów klinicznych. Czułość testów w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgM był niska.

Kuna i wsp. (6) ocenili przydatność ośmiu różnych testów serologicznych, w tym trzech testów immunochromatograficznych, w serodiagnostyce COVID-19. Wykazali wysoką zgodność uzyskanych wyników pomiędzy różnymi testami tylko w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgG. Czułość ocenianych testów immunochromatograficznych wynosiła ponad 85%, ale zależna była w dużej mierze od okresu choroby. Przykładowo, czułość testu Encode COVID-19 IgM/IgG podczas badania próbek uzyskanych 1-3 dni od początku objawów klinicznych wynosiła w klasie IgM i IgG 16%, podczas badania próbek uzyskanych w ciągu 4-7 dni odpowiednio 87% i 92,8% i podczas badania próbek uzyskanych powyżej 8 dni 90%.

Podsumowując uzyskane w prezentowanej pracy rezultaty, należy zwrócić uwagę na duże rozbieżności pomiędzy wynikami testów genetycznych RT-PCR i szybkich, kasetkowych testów immunochromatograficznych. Jest to w głównej mierze związane z kinetyką odpowiedzi humoralnej w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2, co ogranicza

przydatność testów wykrywających przeciwciała do badania wyłącznie próbek uzyskanych w późniejszej fazie choroby. Poważnym ograniczeniem stosowania testów serologicznych do diagnostyki COVID-19 jest również słaba stymulacja przeciwciał u osób, którzy przebyli zakażenie bezobjawowo lub z bardzo słabo wyrażonymi objawami klinicznymi. Co więcej, jak wykazały badania własne i innych autorów, testy kasetkowe odbiegają dodatkowo czułością od testów immunoenzymatycznych ELISA czy też testów CLIA. Istotne są również spore różnice pomiędzy przydatnością testów immunochromatograficznych różnych producentów do rutynowej diagnostyki. Osobnym problemem jest także generalnie bardzo niska czułość testów kasetkowych w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgM. Z powyższych względów testy kasetkowe nie nadają się szybkiej diagnostyki aktualnie trwającego zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie mogą być alternatywą dla testów genetycznych czy nawet antygenowych. Ze względu na dostępność, prostotę wykonania i szybkość uzyskania wyniku testy kasetkowe mogą być jednak wykorzystane do retrospektywnego badania obecności przeciwciał klasy IgG u osób, które przeszły chorobę bądź zostały zaszczepione przeciwko COVID-19. Z powodu wysokiej swoistości, uzyskanie wyniku dodatniego świadczy o kontakcie układu immunologicznego z antygenami wirusa. Ujemny wynik testu kasetkowego, w przypadku podejrzenia przebycia choroby lub po szczepieniu, powinien być jednak potwierdzony bardziej czułymi testami serologicznymi.

PIŚMIENNICTWO

1. *Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M* i inni. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Reviev. Ann. Intern. Med. 2020. DOI: 10.7326/ M20-1301.
2. CliniSciences SARS-CoV-2 (Covid-19): Diagnosis by IgG/IgM Rapid Test. https://www. clinisciences.com/it/read/newsletter-26/sars-cov2-covid-19-diagnosis-by-2264.html.
3. *de Almeida SM, Spalanzani RN, Nogueira MB* i inni. Rapid Serological Tests for SARS-CoV-2: Diagnostic Performance of 4 Commercial Assays. Med Princ Pract 2021; DOI: 10.1159/000516776
4. Johns Hopkins Center for Health Security. Serology testing for COVID-19; https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200228-Serology-testingCOVID.pdf
5. *Krone M, Gütling J, Wagener J* i inni. Performance of Three SARS-CoV-2 Immunoassays, Three Rapid Lateral Flow Tests, and a Novel Bead-Based Affinity Surrogate Test for the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies in Human Serum. J Clin Microbiol 2021; 59: 319-21.
6. *Kuna AT, Milena Hanžek M, Ines Vukasović I* i inni. Comparison of diagnostic accuracy for eight SARS-CoV-2 serological assays. Biochem Med 2021; 31: 010708 doi: 10.11613/BM.2021.010708.
7. *Patel R, Babady E, Theel ES* i inni. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020:Value of Diagnostic Testing for SARS–CoV-2/COVID-19

8. *Pecoraro V, Cassetti T, Meacci M* i inni. Accuracy of the serological detection of IgG and IgM to SARS-Cov-2: a prospective, cross-sectional study. Eur J Clin Microbiol & Infect Dis 2021; https://doi.org/10.1007/s10096-021-04224-3
9. *Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N.* Charakterystyka oraz ocena przydatności serologicznych testów w diagnostyce zakażeń wywołanych przez koronawirus SARS-CoV-2 na podstawie dostępnych danych producentów i przeglądu piśmiennictwa. Przegl Epidemiol 2020; 74: 113-32.
10. To KK, Tsang OT, Leung WS i inni. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis 2020; https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1
11. *Vashist SK*. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. Diagnostics 2020, 10, 202; doi:10.3390/ diagnostics10040202.
12. *Villarreal A, Rangel G, Xu Zhang X* i inni. Performance of a Point of Care Test for Detecting IgM and IgG Antibodies Against SARS-CoV-2 and Seroprevalence in Blood Donors and Health Care Workers in Panama 2021 Front Med 2021; 8: 616106
13. *Zhengtu Li, Yongxiang Yi, Xiaomei Luo* i inni. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. J Med Virol 2020.

Otrzymano: 23 VIII 2021
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy.

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2021,73: 39-52 https://doi.org/10.32394/mdm.73.04

Ocena przydatności testu immunoenzymatycznego ELISA opracowanego we własnym zakresie (in-house ELISA) oraz 11 komercyjnych zestawów ELISA w serologicznej diagnostyce COVID-19

Evaluation of in-house ELISA and 11 commercial ELISA kits in the serological diagnosis of COVID-19

Waldemar Rastawicki, Klaudia Płaza, Adam Pietrusiński

[1]Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

Oceniono przydatność testu in-house ELISA oraz 11 komercyjnych zestawów ELISA w serodiagnostyce COVID-19. Do badań wykorzystano 237 próbek surowicy uzyskanych od 165 osób z potwierdzonym w RT-PCR zakażeniem wirusem SARS-CoV-2. Wykrywalność przeciwciał w poszczególnych testach różniła się dość istotnie i była zależna od okresu choroby w którym uzyskano do badania próbkę surowicy, od klasy poszukiwanych immunoglobulin i rodzaju zastosowanego antygenu. Przeprowadzone badania wykazały wysoką czułość (81,0%) oraz swoistość (97,2%) opracowanego zestawu in-house w stosunku do metody RT-PCR. Czułość testu in-house znacząco wzrosła (98,1%) kiedy badano wyłącznie ozdrowieńców - osoby co najmniej 3 tygodnie po przebytym COVID-19. Komercyjnymi zestawami ELISA najczęściej, zwłaszcza w próbkach uzyskanych w późniejszym okresie choroby, wykrywano przeciwciała klasy IgG (od 44,9% do 89,4%), najrzadziej zaś przeciwciała klasy IgM (od 4,2% do 42,4%).

Słowa kluczowe: *testy immunoenzymatyczne ELISA, SARS-CoV-2, COVID-19, serodiagnostyka, przeciwciała*

ABSTRACT

Introduction: ELISA-Immunoassays can complement the molecular diagnostic methods, and can be one of the important tools of sero-surveillance and vaccine evaluation. The aim of the presented study was to develop in-house ELISA and evaluate 11 commercial

Praca wykonana w ramach realizacji projektu badań własnych nr 1BBBW/2020 oraz planu naukowego nr BB-3/2021 NIZP PZH - PIB na rok 2021

ELISA tests for detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies in serum samples collected from COVID patients.
Methods: In total, 237 serum samples obtained from 165 people with COVID-19 with RT-PCR confirmed SARS-CoV-2 virus infection were used for the study. The specificity of the developed in-house ELISA kit was tested using 170 serum samples obtained from patients with various bacterial and viral infections. The study used an in-house ELISA and 11 commercial ELISA kits developed by various manufacturers.
Results: The presented study showed high sensitivity (81.0%) and specificity (97.2%) of the developed in-house kit in relation to the RT-PCR method. The sensitivity of the in-house test significantly increased (98.1%) when only convalescents - persons at least 3 weeks after COVID-19 were examined. Commercial ELISA kits most frequently detected IgG antibodies (from 44.9% to 89.4%), especially in samples obtained later in the disease, and the least frequent detection of IgM antibodies (from 4.2% to 42.4%).
Conclusions: All the presented ELISA kits may be used in serodiagnosis of COVID-19 however the detection of antibodies in individual tests differed quite significantly and was dependent on the period of the disease, on the class of immunoglobulins and the type of antigen used. The sensitivity of serological tests in the IgG class is clearly higher when examining samples obtained at least 2-3 weeks from the onset of clinical symptoms. Searching for IgA antibodies may be useful mainly in the early phase of the disease while IgM antibodies does not provide significant additional information. In the case of asymptomatic or mild infection, the level of antibodies is low which may be the cause problems with the correct interpretation of epidemiological surveys.

Key words: *ELISA, SARS-CoV-2, COVID-19, serodiagnosis, antibodies*

WSTĘP

W serodiagnostyce COVID-19 wykorzystywane są różne testy wykrywające w próbkach surowicy badanych osób obecność swoistych przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 (1, 2, 12, 14, 18). Badania przeprowadzone uprzednio w NIZP PZH-PIB wykazały ograniczoną przydatność szybkich, kasetkowych testów immunochromatograficznych do badania osób chorych. Zasugerowano więc, że ujemny wynik szybkiego testu kasetkowego, w przypadku podejrzenia przebycia choroby lub po szczepieniu, powinien być potwierdzony bardziej czułymi testami serologicznymi, takimi chociażby jak testy immunoenzymatyczne ELISA (16).

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności testu immunoenzymatycznego ELISA opracowanego we własnym zakresie (in-house ELISA) oraz 11 wybranych, komercyjnych testów ELISA różnych producentów, do poszukiwania przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2.

MATERIAŁ I METODY

1. Badane próbki surowicy. Ogółem do badań wykorzystano 237 próbek surowicy uzyskanych od 165 osób z COVID-19 z potwierdzonym w RT-PCR zakażeniem wiru-

sem SARS-CoV-2. Próbki te uzyskano w okresie od kilku dni do kilkunastu tygodni od początku objawów klinicznych. Od 70 pacjentów szpitalnych uzyskano po dwie próbki surowicy w odstępie kilku dni. Liczba badanych próbek surowicy w poszczególnych zestawach ELISA była różna (Tabela I). Dodatkowo, w celu wyznaczenia diagnostycznie znamiennego poziomu przeciwciał w zestawie in-house ELISA wykorzystano 84 próbki surowicy uzyskane od krwiodawców. Poziom ten wyznaczono na wysokości średniej arytmetycznej wartości $OD_{450/620}$ powiększonej o trzy odchylenia standardowe. Swoistość opracowanego zestawu in-house ELISA badano przy użyciu 170 próbek surowicy uzyskanych od osób z różnymi zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi, w tym: z krztuścem (N=30), legionelozą (N=23), mykoplazmozą (N=27), grypą (N=37), odrą (N=17), zakażeniem *C. pneumoniae* (N=20) i HCV (N=16). Wszystkie surowice od osób z grup kontrolnych uzyskano przed wybuchem epidemii SARS-CoV-2.

2. Testy immunoenzymatyczne ELISA. W badaniach wykorzystano test in-house ELISA opracowany we własnym zakresie oraz 11 komercyjnych zestawów ELISA opracowanych przez różnych producentów. Metodykę badania zestawem in-house podano poniżej natomiast badania komercyjnymi testami ELISA wykonywano zgodnie z instrukcjami producentów.
   2.1. Test in-house ELISA. Zastosowano opracowany we własnym zakresie w NIZP PZH-PIB pośredni test immunoenzymatyczny ELISA. W badaniach nad opracowaniem testu wykorzystano dwa preparaty antygenowe firmy NativeAntigen oparte o rekombinowane białko S1 wirusa (SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein (S1), Sheep Fc-Tag (HEK293; numer katalogowy REC31806) oraz rekombinowane białko N wirusa (SARS-CoV-2 Nucleoprotein, HIS-Tag *E. coli*, numer katalogowy REC31851). Na wstępnym etapie pracy ustalono stężenie białek S1 i N oraz opracowano metodykę przeprowadzania testu z określeniem rozcieńczenia badanych próbek surowicy, koniugatów (IgA, IgG), chromogenu, sposobu odczytu absorbancji oraz czasu przeprowadzania poszczególnych etapów odczynu. Po analizie wstępnych badań z zastosowaniem osobno obydwu preparatów białkowych przyjęto, że studzienki płytki metapleksowej MAXISORP firmy NUNC (nr kat. 449824) będą docelowo opłaszczane mieszaniną obydwu białek. Po całonocnej inkubacji opłaszczonych płytek w temperaturze 4-8°C oraz 2-krotnym płukaniu roztworem PBS+Tween, receptorowe powierzchnie dołków blokowano przez 1 godzinę 5% roztworem odtłuszczonego mleka. Po ponownym 2-krotnym płukaniu, badane próbki surowicy oraz trzy surowice kontrolne (ujemna, cut-off i dodatnia) rozcieńczano w stosunku 1:101 w buforze PBS-0,5% roztwór mleka, dodawano do dołków płytki i inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C. Następnie, po kolejnym 4-krotnym płukaniu, dodawano do dołków roztwór odpowiednich koniugatów: Anti-Human IgG Fc (Goat) Antibody Peroxidase Conjugated firmy Rockland (nr kat. 609-1303) w rozcieńczeniu 1/40.000 oraz Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/HRP firmy Dako (nr kat. P0216) w rozcieńczeniu 1/1.200. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze 37°C i 6-krotnym płukaniu do dołków dodawano następnie chromogen TMB-Complete 2 ref. TMBOL1 firmy testLine. Reakcję barwną przerywano po 10 minutach dodając 1 N roztwór kwasu siarkowego. Pomiaru

intensywności reakcji barwnej (OD) dokonywano w czytniku Infinite F50 firmy TECAN przy długości fali 450 nm i fali referencyjnej 620 nm. W celu wyznaczenia indeksu poziomu przeciwciał wartość $OD_{450/620}$ badanej próbki dzielono przez wartość $OD_{450/620}$ surowicy cut-off i mnożono przez 10. Za wynik dodatni testu przyjmowano indeks przeciwciał >12, za wynik wątpliwy 8-12 i za wynik ujemny indeks <8.

2.2. Test firmy Euroimmun. W badaniach wykorzystano półilościowy zestaw ELISA IgG/IgA firmy Euroimmun nr kat. EI 2606-9601. W zestawie producent jako antygen zastosował białko S1 wirusa SARS-CoV-2. Za wynik dodatni uznawano wartość >1,1 za wynik wątpliwy 0,8-1,1 NTU, a za wynik ujemny < 0,8 NTU.

2.3. Test firmy NovaTec Immunodiagnostica (Niemcy) – NovaLisa SARS-CoV-2 (Covid-19) IgA, IgG, IgM, nr kat. COV A/G/M 0940. W zestawie producent jako antygen zastosował nukleokapsyd (białko N) wirusa SARS-CoV-2. Za wynik dodatni uznawano wartość >11 NTU (NovaTec Units), za wynik wątpliwy 9-11 NTU, a za wynik ujemny < 9 NTU.

2.4. Test firmy TestLine Clinical Diagnostics (Czechy) - EIA COVID-19 NP IgA/IgG/IgM, nr kat. CoNA/G/M96. W zestawie wykorzystano jako antygen nukleokapsyd (białko N) wirusa SARS-CoV-2. Zastosowano cztery kontrolne kalibratory, odpowiednio o poziomie przeciwciał 5 U/ml, 20 U/ml (cut-off), 80 U/ml oraz 320 U/ml. Wartość indeksu przeciwciał powyżej 1,1 uznawano za wynik dodatni, 0,9-1,1 za wynik wątpliwy i poniżej 0,9 na ujemny.

2.5. Test firmy Epitope Diagnostics (USA)-EDI Novel Coronavirus COVID-19 IgG/IgM ELISA Kit, nr kat. KT-1032. Producent zastosował jako antygen kompletny nukleokapsyd (białko N) wirusa SARS-CoV-2. Wartość cut-off (dodatnia i ujemna) wyznaczana jest każdorazowo wobec kontroli ujemnej.

2.6. Test firmy FAMID Biomedical Technology (Tianjin, Chiny) - COVID-19 IgG/IgM ELISA Kit, nr kat. F3022/F3023. Producent nie podaje jaki zastosował antygen. Absorbancja surowicy kontrolnej ujemnej ≥ 1 świadczy o wyniku dodatnim.

2.7. Test firmy Vircell (Hiszpania) - COVID-19 ELISA IgG, nr kat. G1032. W zestawie zastosowano mieszaninę antygenów S oraz N. Według danych producenta indeks przeciwciał poniżej 4 świadczy o wyniku ujemnym, indeks 4-6 o wyniku wątpliwym, natomiast powyżej 6 o wyniku dodatnim.

2.8. Test firmy Generic Assays GmbH (Niemcy) – GA CoV-2 IgG, nr kat. 3920. Jako antygen producent zastosował białka N, S1 i S2. Indeks przeciwciał na poziomie 1,1 – 3,0 świadczy o wyniku słabo dodatni, zaś na poziomie >3 o dodatnim.

2.9. Test Actim Medix Biochemica (Finlandia) – SARS-CoV-2 IgG ELISA kit, product code 35530ETAC. Płytki w zestawie ELISA zostały opłaszczone rekombinowanym białkiem S1. Zastosowano 6 kalibratorów od 0,0 do 1,137 µg/ml. Za kliniczne znamienne producent przyjął poziom przeciwciał w badanych próbkach surowicy na poziomie >0,5 µg/ml.

2.10. Test firmy BIO-RAD - Platelia SARS-CoV-2 Total Ab, nr kat. 72710. Test służy do wykrywania przeciwciał łącznych klas IgM/IgA/IgG dla nukleokapsydu wirusa (białko N) SARS-CoV-2 w próbkach surowicy lub osocza.

2.11. Test INgezim®COVID 19 DR 50.CoV.K0 firmy Eurofins Ingenasa (Hiszpania). W zestawie dołki metapleksowej płytki opłaszczono białkiem nukleokapsydu (białko N). Po inkubacji z badaną surowicą w kolejnym etapie zamiast koniugatu przeciwciał z enzymem dodawano białko N sprzężone z peroksydazą chrzanową. Test wykrywa obecność wszystkich klas przeciwciał swoistych dla białka N wirusa SARS-CoV-2.

2.12. Test Wantai SARS-CoV-2 IgG ELISA (Chiny), nr kat. WS-1396. Producent nie podaje jaki zastosował antygen. Jest to test ilościowy, w którym poziom przeciwciał określany jest w jednostkach Wantai. Jednostki te są wystandaryzowane wobec standardu NIBSC 20/136. Producent podaje, że 1 Wantai U/ml równa się 5,4 IU/ml NIBSC 20/136. W prezentowanej pracy za wynik dodatni przyjęto wartość 1,85 Wantai U/ml (10 IU/ml NIBSC 20/136).

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli I zestawiono wyniki uzyskane w 12 różnych zestawach ELISA podczas poszukiwania przeciwciał swoistych dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19. Tylko testem in-house ELISA i komercyjnym testem firmy Euroimmun w klasie IgA i IgG zbadano wszystkie 237 próbek surowicy. Przeciwciała klasy IgA wykrywano testem Euroimmun znacząco częściej (82,7%) niż testem in-house ELISA (57,4%). Przeciwciała klasy IgG w obydwu testach wykrywano w prawie identycznym odsetku próbek (73,0%-73,8%). Analizując łącznie obydwie klasy immunoglobulin, czułość zestawu in-house ELISA wynosiła 81,0%, natomiast swoistość 97,2% w stosunku do metody RT-PCR. Trzeba podkreślić, że wyniki wątpliwe uzyskane w teście nie włączono do obliczeń czułości i swoistości.

Odsetek wyników dodatnich w klasie IgA oraz IgG w pozostałych testach komercyjnych obliczono badając znacznie mniejszą liczbę surowic. Przeciwciała klasy IgA w teście firmy Novatec wykryto w 55,4%, a w teście firmy TestLine w 43,3% próbek surowicy. Najczęściej przeciwciała klasy IgG dla wirusa SARS-CoV-2 wykrywano zestawem firmy ACTIM (89,5%), Vircell (80,8%) oraz Generic (79,5%), najrzadziej zaś testem Epitope (44,9%), TestLine (56,7%) i Novatec (59,5%). W przypadku testu BIO-RAD oraz Ingezim poszukiwano w badanych próbkach przeciwciał w łącznych klasach IgA/G/M. Na szczególną uwagę zasługują wyniki badania przeciwciał klasy IgM. We wszystkich testach przeciwciała tej klasy wykrywano znacząco rzadziej niż przeciwciała klasy IgG i IgA. W skrajnych przypadkach, np. testem firmy Famid czy Novatec, przeciwciała klasy IgM wykrywano tylko w pojedynczych próbkach surowicy uzyskanych od osób z COVID-19.

Trzeba pamiętać, że poziom wykrywanych przeciwciał w dużej mierze zależny jest od okresu choroby, w którym pobrano do badania próbkę krwi. W poszczególnych zestawach ELISA badano różną liczbę próbek surowicy, uzyskanych w różnym czasie od początku objawów klinicznych, co mogło w przypadku niektórych testów mieć wpływ na obserwowane różnice w wykrywalności przeciwciał.

Analizując wpływ okresu choroby na poziom wykrywanych przeciwciał w poszczególnych klasach immunoglobulin w tabeli II porównano wyniki poszczególnych testów ELISA podczas badania próbek surowicy uzyskanych dwukrotnie, w odstępie kilku dni, od tych samych hospitalizowanych osób. Przeprowadzone badania wykazały we wszyst-

Tabela I. Wyniki uzyskane w 12 różnych zestawach ELISA podczas poszukiwania przeciwciał swoistych dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy osób z COVID-19.

Zestaw ELISA	Klasa	Liczba próbek	Liczba (odsetek) wyników		
			Dodatnim	Wątpliwym	Ujemnym
in-house ELISA	IgA	237	136 (57,4%)	20 (8,4%)	81 (34,2%)
	IgG	237	175 (73,8%)	9 (3,8%)	53 (22,4%)
Euroimmun	IgA	237	196 (82,7%)	18 (7,6%)	23 (9,7%)
	IgG	237	173 (73,0%)	12 (5,1%)	52 (21,9%)
	IgM	85	36 (42,4%)	4 (4,7%)	45 (52,9%)
Novatec	IgA	74	41 (55,4%)	5 (6,8%)	28 (37,8%)
	IgG	74	44 (59,5%)	9 (12,2%)	21 (28,4%)
	IgM	74	6 (8,1%)	2 (2,7%)	66 (89,2%)
Testline	IgA	60	26 (43,3%)	1 (1,7%)	33 (55,0%)
	IgG	60	34 (56,7%)	3 (5,0%)	23 (38,3%)
	IgM	60	22 (36,7%)	2 (3,3%)	36 (60,0%)
Epitope	IgG	107	48 (44,9%)	15 (14,0%)	44 (41,1%)
	IgM	107	42 (39,3%)	10 (9,3%)	55 (51,4%)
Famid	IgG	72	45 (62,5%)	-	27 (37,5%)
	IgM	72	3 (4,2%)	-	69 (95,8%)
Vircell	IgG	73	59 (80,8%)	1 (1,4%)	13 (17,8%)
Generic	IgG	73	58 (79,5%)	2 (2,7%)	13 (17,8%)
ACTIM	IgG	142	127 (89,4%)	-	15 (10,6%)
Wantai	IgG	82	62 (75,6%)	-	20 (24,4%)
BIO-RAD	IgA/G/M	132	106 (80,3%)	3 (2,3%)	23 (17,4%)
Ingezim	IgA/G/M	48	29 (60,4%)	6 (12,5%)	13 (27,1%)

kich testach wyższy odsetek wyników dodatnich podczas badania próbek uzyskanych powtórnie po kilku dniach. Co ciekawe, zależność ta dotyczyła nie tylko przeciwciał klasy IgG, ale również przeciwciał klasy IgA i IgM, które uważane są za immunoglobuliny pojawiające się dość szybko w przebiegu zakażenia. I tak, przykładowo, w teście ELISA firmy Euroimmun odsetek wyników dodatnich wzrósł z 40,0% do 90,0% podczas badania przeciwciał klasy IgG, z 70,0% do 95,7% podczas badania przeciwciał klasy IgA oraz z 38,1% do 47,6% podczas badania przeciwciał klasy IgM. Jak można łatwo zauważyć na przykładzie tego zestawu, w próbkach surowicy uzyskanych we wczesnym okresie choroby, zdecydowanie częściej wykrywano przeciwciała klasy IgA niż klasy IgG.

Tabela II. Porównanie wyników uzyskanych w 12 różnych zestawach ELISA podczas poszukiwania przeciwciał swoistych dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy uzyskanych dwukrotnie w różnych okresach (poniżej i powyżej 7 dni od początku objawów klinicznych) od hospitalizowanych osób z COVID-19.

Zestaw ELISA	Klasa	Liczba osób	Liczba (odsetek) wyników dodatnich	
			< 7 dni	>7 dni
in-house ELISA	IgA	70	37 (52,9%)	54 (77,1%)
	IgG	70	32 (45,7%)	61 (87,1%)
Euroimmun	IgA	70	49 (70,0%)	67 (95,7%)
	IgG	70	28 (40,0%)	63 (90,0%)
	IgM	42	16 (38,1%)	20 (47,6%)
Novatec	IgA	23	10 (43,5%)	16 (69,6%)
	IgG	23	11 (47,8%)	19 (82,6%)
	IgM	23	-	2 (8,7%)
Testline	IgA	27	11 (40,7%)	12 (44,4%)
	IgG	27	11 (40,7%)	19 (70,4%)
	IgM	27	8 (29,6%)	12 (44,4%)
Epitope	IgG	32	7 (21,9%)	19 (59,4%)
	IgM	32	9 (28,1%)	17 (53,1%)
Famid	IgG	29	13 (44,8%)	23 (79,3%)
	IgM	29	-	1 (3,4%)
Vircell	IgG	26	16 (61,5%)	26 (100%)
Generic	IgG	26	14 (53,8%)	26 (100%)
ACTIM	IgG	47	36 (76,6%)	43 (91,5%)
Wantai	IgG	29	20 (69,0%)	27 (93,1%)
BIO-RAD	IgA/G/M	39	27 (69,2%)	38 (97,4%)
Ingezim	IgA/G/M	23	10 (43,5%)	18 (78,3%)

Jak istotny na czułość testu jest odpowiednio długi czas potrzebny na produkcję przeciwciał klasy IgG po kontakcie z patogenem mogą świadczyć wyniki badania 53 próbek surowicy uzyskanych od ozdrowieńców, tj. osób z przebytym COVID-19 co najmniej trzy tygodnie wcześniej. Odsetek wyników dodatnich w klasie IgG zarówno w teście in-house ELISA jak i teście firmy Euroimmun podczas badania ozdrowieńców był znacząco wyższy niż wyliczony dla wszystkich badanych osób chorych i wynosił odpowiednio 98,1% i 96,2%.

Ciekawych obserwacji dokonano porównując nie tylko wpływ okresu choroby czy też klasy immunoglobulin ale także rodzaju zastosowanego w zestawie ELISA antygenu na poziom wykrywanych przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 (Tabela III). Na potrzeby tej analizy przedstawiono szczegółowe wyniki badania dwóch próbek surowicy uzyskanych od 54-letniej pacjentki z COVID-19, rozszerzone o zastosowanie w zestawie in-house ELISA osobno dwóch rekombinowanych antygenów: białka S1 i białka N. Przeprowadzone badania pierwszej próbki surowicy wykazały, że odczynem in-house ELISA wykryto na diagnostycznie znamiennym poziomie przeciwciała klasy IgA i IgG wyłącznie dla nukleokapsydu (białko N). Również zestawy komercyjne oparte na tym antygenie

(np. firmy Novatec czy Testline) już w pierwszej próbce surowicy wykryły bardzo wysoki poziom przeciwciał klasy IgA i IgG. Z drugiej strony, zestawy oparte wyłącznie na białku S1 (np. zestawu firmy Euroimmun czy też generalnie bardzo czułego zestawu firmy ACTIM) nie wykryły w pierwszej próbce surowicy uzyskanej od tej pacjentki przeciwciał klasy IgG na diagnostycznie znamiennym poziomie. Co więcej, dokładna analiza wyników uzyskanych podczas wstępnych badań nad opracowaniem zestawu in-house ELISA wykazała, że przeciwciała dla białka N wykrywano generalnie częściej niż dla białka S. Z drugiej strony, stwierdzano jednak przypadki, w których wykrywano obecność prze-

Tabela III. Wyniki uzyskane w różnych zestawach ELISA podczas poszukiwania przeciwciał swoistych dla wirusa SARS-CoV-2 w próbkach surowicy uzyskanych dwukrotnie od hospitalizowanej pacjentki w wieku 54 lat z COVID-19. W przypadku zestawu in-house ELISA zastosowano trzy różne preparaty antygenowe.

Zestaw ELISA	Klasa przeciwciał	Próbka nr 1 (10 dni od początku objawów)	Próbka nr 2 (16 dni od początku objawów)
in-house ELISA (antygen S1)	IgA	2,3 (-)	7,2 (-)
	IgG	2,0 (-)	10,1 (-)
in-house ELISA (antygen N)	IgA	29,5 (+)	100 (+)
	IgG	46,6 (+)	58,8 (+)
in-house ELISA (mix S1+N)	IgA	16,1 (+)	81,8 (+)
	IgG	24,7 (+)	32,4 (+)
Euroimmun	IgA	1,8 (+)	8,1 (+)
	IgG	0,7 (-)	6,2 (+)
	IgM	2,7 (+)	3,0 (+)
Novatec	IgA	26,0 (+)	48,0 (+)
	IgG	27,0 (+)	32,0 (+)
	IgM	7,34 (-)	4,7 (-)
Testline	IgA	2,5 (+)	11,0 (+)
	IgG	>10 (+)	>10 (+)
	IgM	0,9 (-)	2,5 (+)
Epitope	IgG	nie badano	nie badano
	IgM	nie badano	nie badano
Famid	IgG	6,3 (+)	6,7 (+)
	IgM	0,2 (-)	0,2 (-)
Vircell	IgG	8,6 (+)	9,2 (+)
Generic	IgG	1,5 (+)	2,0 (+)
ACTIM	IgG	0,7 (+/-)	>1,0 (+)
Wantai	IgG	25,9 (+)	11,9 (+)
BIO-RAD	IgA/G/M	>5,0 (+)	>5,0 (+)
Ingezim	IgA/G/M	50,6 (+)	53,8 (+)

ciwciał wyłącznie dla białka S. Z tego zresztą powodu zdecydowano się zastosować jako antygen w zestawie in-house ELISA mieszaninę obydwu rekombinowanych białek. Także w przypadku infekcji wywoływanych przez koronawirusy przeciwciała w klasie IgM są w większości skierowane przeciwko białku N. Takie wyniki mogą świadczyć, że przeciwciała skierowane dla białka N są intensywniej produkowane i pojawiają się szybciej w przebiegu choroby niż przeciwciała dla białka S.

W tabeli IV porównano zgodność wyników uzyskanych w teście in-house oraz w poszczególnych komercyjnych zestawach ELISA. Generalnie, zgodność uzyskanych wyników była wysoka. Podczas poszukiwania przeciwciał klasy IgG najwyższą zgodność wyników z opracowanym przez nas testem uzyskano w zestawie firmy Test-Line (96,0%) i Novatec (91,8%), najniższą zaś w teście firmy Wantai (70,1%) i Famid (75,4%). W przypadku badania przeciwciał klasy IgA zgodność wyników testu in-house i testów Novatec oraz TestLine wynosiła odpowiednio 83,6% oraz 82,4%. Bardzo duża wykrywalność przeciwciał klasy IgA przez zestaw firmy Euroimmun była przyczyną niskiej zgodności wyników z testem in-house przy poszukiwaniu tej klasy immunoglobulin (67,6%). Trzeba pamiętać, że obserwowane różnice w uzyskiwanych w poszczególnych zestawach wynikach mogą zależeć nie tylko od użytego preparatu antygenowego ale również od przyjętego przez producenta poziomu cut-off.

W celu określenia swoistości opracowanego zestawu in-house, badaniom poddano próbki surowicy uzyskane od 170 osób z różnymi zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi. Przeprowadzone badania wykazały bardzo wysoką swoistość opracowanego zestawu in-house, odpowiednio 98,0% w klasie IgA oraz 97,6% w klasie IgG. W prezentowanej pracy nie sprawdzano swoistości komercyjnych zestawów ELISA przy użyciu próbek surowicy osób z grupy kontrolnej. Wyjątek stanowiło wybranych 21 próbek surowicy o podwyższonym poziomie nieswoistych przeciwciał wykrytych w teście in-house, które postanowiono sprawdzić również w odczynie ELISA firmy Euroimmun. Badania wykazały obecność nieswoistych reakcji aż w 9 przypadkach (7 wyników dodatnich i 2 wątpliwe) w klasie IgA oraz 5 przypadkach (4 wyniki dodatnie i 1 wątpliwy) w klasie IgG. Tak więc, nie jest wykluczone, że niektóre dodatnie wyniki uzyskane testem Euroimmun IgA w naszych badaniach podczas badania osób z COVID-19 mogą być nieswoiste. Problem ograniczonej swoistości testu zauważył zresztą sam producent podając, że pomimo zastosowania swoistego antygenu część próbek od zdrowych dawców krwi pobranych przed pandemią COVID-19 dała pozytywne wyniki w teście ELISA Anty-SARS-CoV-2 (IgA) podczas badań wewnętrznych (do 12,7%). Producent zaleca, aby nie stosować testu ELISA Anty-SARS-CoV-2 (IgA) do badań przesiewowych osób bez objawów, ale jedynie do śledzenia odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z potwierdzonymi zakażeniami SARS-CoV-2 (4). Aktualnie producent zastosował nowy rodzaj buforu do rozcieńczania próbek, który ma zminimalizować występowanie nieswoistych reakcji.

Obecne na rynku testy ELISA, w zależności od zastosowanego preparatu antygenowego, wykrywają zazwyczaj przeciwciała dla dwóch różnych antygenów wirusa SARS-CoV-2: białka nukleokapsydu (białko N) lub białka kolca (białko S). U osób zakażonych, chorych na COVID-19, obecne są w surowicy przeciwciała zarówno dla białka N jak i białka S. U osób szczepionych produkowane są tylko przeciwciała dla białka S. Z tego powodu do badania odpowiedzi poszczepiennej mogą być wykorzystane wyłącznie testy,

Tabela IV. Porównanie częstości wykrywania przeciwciał klasy IgA i IgG dla wirusa SARS-CoV-2 zestawem in-house ELISA opracowanym we własnym zakresie oraz zestawami komercyjnymi. W tabeli nie uwzględniono wyników wątpliwych. W przypadku zestawu firmy Bio-Rad i Ingezim wyniki w łącznych klasach Ig A/G/M porównano do wyników w klasie IgG w zestawie in-house ELISA.

Zestaw ELISA komercyjny			Zestaw in-house ELISA				Liczba (%) wyników zgodnych
			IgA		IgG		
			+	-	+	-	
Euroimmun	IgA	+	131	72	NB	NB	161 67,6%
		-	5	30	NB	NB	
	IgG	+	NB	NB	163	7	221 89,8%
		-	NB	NB	18	58	
Novatec	IgA	+	32	5	NB	NB	51 83,6%
		-	5	19	NB	NB	
	IgG	+	NB	NB	39	4	56 91,8%
		-	NB	NB	1	17	
Test-Line	IgA	+	24	2	NB	NB	47 82,4%
		-	8	23	NB	NB	
	IgG	+	NB	NB	31	-	48 96,0%
		-	NB	NB	2	17	
Famid	IgG	+	NB	NB	33	6	49 75,4%
		-	NB	NB	10	16	
Epitope	IgG	+	NB	NB	48	-	75 84,3%
		-	NB	NB	14	27	
Vircell	IgG	+	NB	NB	47	9	58 80,6%
		-	NB	NB	5	11	
Generic	IgG	+	NB	NB	49	6	62 84,9%
		-	NB	NB	5	13	
ACTIM	IgG	+	NB	NB	100	19	113 85,0%
		-	NB	NB	1	13	
Wantai	IgG	+	NB	NB	46	13	54 (70,1%)
		-	NB	NB	10	8	
BIO-RAD	Ig A/G/M	+	NB	NB	87	14	107 87,0%
		-	NB	NB	2	20	
Ingezim	Ig A/G/M	+	NB	NB	21	4	33 89,2%
		-	NB	NB	-	12	

w których producent zastosował jako preparat antygenowy białko S. Użycie testów z białkiem N u osób szczepionych, którzy nie przeszli zakażenia, da wynik ujemny (16).

Testy serologiczne, w których jako antygen wykorzystano podjednostkę S1 białka S, cechują się wysoką swoistością, ponieważ podjednostka S1 cechuje się najniższą homologią z analogicznymi regionami innych patogennych dla człowieka koronawirusów. Dodatkowo, podjednostka S1 stanowi główny cel wiązania przeciwciał neutralizujących, pełniących kluczową rolę w mechanizmach odporności przeciwko SARS-CoV-2**.** W podjednostce S1 obecna jest również domena wiążąca receptor (ang. *receptor-binding domain*, RBD), aktywna podczas fuzji SARS-CoV-2 z komórką gospodarza. RBD poprzez związanie docelowego receptora umożliwia inwazję wirusów do wnętrza komórek nabłonka górnych dróg oddechowych, a to rozpoczyna kaskadę reakcji, która prowadzi do rozwoju COVID-19 (4, 5, 10).

Generalnie, testy ELISA wykrywające przeciwciała dla wirusa SARS-CoV-2 można podzielić na testy półilościowe (podające poziom przeciwciał w jednostkach arbitralnych, przyjętych przez konkretnego producenta) oraz testy ilościowe (poziom przeciwciał podawany jest w ujednoliconych międzynarodowych jednostkach BAU/ml). Ze względu na fakt, że badania rozpoczęto jeszcze przed wprowadzeniem testów ilościowych w kierunku COVID-19, w aktualnie prezentowanej pracy wykorzystano testy półilościowe. Trzeba mieć jednak na uwadze, że trudno jest porównywać pomiędzy sobą wyniki uzyskane różnymi testami półilościowymi. Testy ilościowe, wykazujące wysoką korelację z materiałem referencyjnym WHO (NIBSC code: 20/136), umożliwiają porównanie wyników uzyskanych w różnych laboratoriach oraz na ocenę dynamiki zmian stężenia przeciwciał klasy IgG w czasie.

Aktualnie w diagnostyce COVID-19 używanych jest bardzo dużo różnych zestawów ELISA, zarówno komercyjnych jak i opracowanych samodzielnie przez poszczególne laboratoria. Celem prezentowanej pracy nie jest omawianie wyników badań przeprowadzonych przez innych autorów, nie mniej jednak chcieliśmy zwrócić uwagę na pewne charakterystyczne, powtarzające się cechy. Czułość testów ELISA w badaniach prowadzonych przez *Dörschug* i wsp. (3) wahała się od 21,0% do 74,3% w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgA oraz od 63,0% do 81,0% w przypadku przeciwciał klasy IgG. Podczas badania przeciwciał klasy IgM zestawem firmy Virotech czułość ta wyniosła zaledwie 17,0%. Swoistość zestawów ELISA była wysoka i wahała się od 84,3% do 100%. Autorzy stwierdzili silną zależność poziomu wykrywanych przeciwciał klasy IgG od okresu choroby, w którym uzyskano próbkę do badań. *Harritshøj LH* i wsp. (6) określili czułość i swoistość zestawu ELISA firmy Euroimmun IgG odpowiednio na 78,0% oraz 99,2%. Większą czułością i swoistością charakteryzował się zestaw ELISA Wantai – Total Ab, odpowiednio 96,7% oraz 99,5%. Tak jak w innych badaniach, wykrywalność przeciwciał była skorelowana z momentem pobrania próbki do badań oraz z ciężkością objawów klinicznych choroby. Autorzy konkludują, że testy serologiczne mają niską czułość podczas badania próbek uzyskanych poniżej 3 tygodni od początku objawów klinicznych, zwłaszcza od osób z lekko przebiegającą chorobą. W innych badaniach, przeprowadzonych przez *Krone* i wsp. (8) czułość testu ELISA firmy Mikrogen wynosiła 31,6% w klasie IgA i 79,0% w klasie IgG, testu ELISA firmy Euroimmun 91,2% w klasie IgA i IgG i testu ELISA Virion/Serion 82,5% w klasie IgA i 98,3% w klasie IgG. Badania autorów wykazały wyższą czułość testów ELISA w porównaniu do szybkich

testów immunchromatograficznych. Niska przydatność poszukiwania przeciwciał klasy IgM dla wirusa SARS-CoV-2 opisywana przez wielu autorów została również potwierdzona przez *Kuna* i wsp. (9). W badaniach tych autorów nie było ani jednego przypadku dodatniego w klasie IgM i ujemnego w klasach IgA/IgG. *Kohmer* wsp. (7) badając próbki uzyskane 5-9 dni od początku objawów klinicznych od pacjentów z COVID-19 określili czułość testu ELISA- IgG firmy Euroimmun na 58,8%, natomiast testu ELISA-IgG firmy Vircel na 70,6%. Czułość obydwu testów wzrosła w przypadku badania próbek surowicy uzyskanych w okresie 10-18 dni od początku objawów klinicznych do odpowiednio 93,8% oraz 100%. Wyższa czułość testu Vircell może być związana z zastosowaniem w tym zestawie jako antygenu nie jednego białka S1, jak w zestawie firmy Euroimmun, ale dwóch białek, tzn. białka S1 i białka N. *Nicholson* i wsp. (11) badając próbki uzyskane powyżej 14 dni od początku objawów klinicznych najwyższą czułość uzyskali w przypadku zastosowania testu ELISA firmy Wantai total Ab (100%) a następnie testu firmy Euroimmun NCP-IgG z białkiem nukleokapsydu (93,1%), testu firmy Euroimmun S1-IgG z białkiem szczytowym S1(90,3%), testu firmy Euroimmun S1-IgA (88,9%) i testu Wantai IgM (83,3%). Jak można zauważyć z tego krótkiego przeglądu piśmiennictwa, wyniki uzyskane tymi samymi testami w poszczególnych badaniach potrafią różnić się od siebie dość istotnie. Główną tego przyczyną są różnice w doborze próbek surowicy od pacjentów z COVID-19.

Podsumowując, opracowany w NIZP PZH-PIB zestaw in-house ELISA wykazał się wysoką czułością i swoistością w poszukiwaniu przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 i nie odbiega przydatnością diagnostyczną od komercyjnych zestawów wiodących producentów. W zestawie tym, podobnie zresztą jak w wielu innych (np. firmy Vircell czy Generic) zastosowano mieszaninę dwóch rekombinowanych białek: białka szczytowego S1 i białka nukleokapsydu (N). Pozwoliło to na zwiększenie czułości podczas badania próbek surowicy uzyskanych zwłaszcza we wczesnym okresie choroby, a także umożliwiło badanie przeciwciał poszczepiennych, skierowanych wyłącznie dla białka S (15). Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki dobrze korespondują z wynikami innych autorów. Czułość testów serologicznych w klasie IgG jest wyraźnie wyższa podczas badania próbek uzyskanych co najmniej 2-3 tygodnie od początku objawów klinicznych niż uzyskanych w początkowej fazie choroby. Poszukiwanie przeciwciał klasy IgA może być przydatne głównie we wczesnej fazie choroby, kiedy nie można oczekiwać jeszcze znamiennego poziomu przeciwciał klasy IgG. Z przeprowadzonych przez nas badań, jak również badań innych autorów wynika, że poszukiwanie przeciwciał klasy IgM, zarówno testami kasetkowymi jak i testami ELISA, nie wnosi istotnych, dodatkowych informacji w porównaniu do badania przeciwciał klasy IgA i IgG. Inną, bardzo istotną cechą, jest wyraźna zależność pomiędzy poziomem wykrywanych przeciwciał dla wirusa SARS-CoV-2 a obrazem objawów klinicznych. W przypadku bezobjawowo lub lekko przebiegającego zakażenia poziom generowanych przez organizm przeciwciał jest niski (13, 17, 19). Właściwość ta może stwarzać problem w serologicznych badaniach epidemiologicznych, mających na celu poznanie częstości występowania zakażeń, w tym bezobjawowych, w danej populacji.

PIŚMIENNICTWO

1. *Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M* i inni. Diagnostic testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Reviev. Ann Intern Med 2020; DOI: 10.7326/ M20-1301.
2. *de Almeida SM, Spalanzani RN, Nogueira MB* i inni. Rapid serological tests for SARS-CoV-2: Diagnostic performance of 4 commercial assays. Med Princ Pract 2021; DOI: 10.1159/000516776
3. *Dörschug A, Schwanbeck J, Hahn A* i inni. Comparison of five serological assays for the detection of SARS-CoV-2 antibodies. Diagnostics 2021, 11, 78.
4. *Euroimmun blog:* https://euroimmun.pl/blog/dlaczego-badac-przeciwciala-klasy-iga--przeciwko-sars-cov-2/
5. *Giordano* D*, De Masi L, Argenio MA, Facchiano* A. Structural dissection of viral spike-protein binding of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1 to the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as cellular receptor. Biomedicines 2021; 18; 9(8):1038, doi: 10.3390/biomedicines9081038
6. *Harritshøj LH, Gybel-Brask M, Afzal S* i inni. Comparison of 16 serological SARS--CoV-2 immunoassays in 16 clinical laboratories. J Clin Microbiol 2021; 59: 1-11.
7. *Kohmer N, Westhaus S, Rüh C* i inni. Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests. J Med Virol. 2020;92:2243–2247
8. *Krone M, Gütling J, Wagener J* i inni. Performance of three SARS-CoV-2 immunoassays, three rapid lateral flow tests, and a novel bead-based affinity surrogate test for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in human serum. J Clin Microbiol 2021; 59, 8.
9. *Kuna AT, Hanžek M, Vukasović I* i inni. Comparison of diagnostic accuracy for eight SARS-CoV-2 serological assays. Biochem Med 2021; 31(1): 010708
10. *Long* Y*, Song* S*, Feiyang Luo F* i inni. A non-RBM targeted RBD specific antibody neutralizes SARS-CoV-2 inducing S1 shedding. Biochem Biophys Res Commun 2021; 24; 571:152-158.
11. *Nicholson S, Karapanagiotidis T, Khvorov A* i inni. Evaluation of 6 commercial SARS-CoV-2 serology assays detecting different antibodies for clinical testing and serosurveillance. Open Forum Infect Dis 2021, DOI: 10.1093/ofid/ofab239
12. *Pecoraro V, Cassetti T, Meacci M* i inni. Accuracy of the serological detection of IgG and IgM to SARS-Cov-2: a prospective, cross-sectional study. Eur J Clin Microbiol & Infect Dis 2021; https://doi.org/10.1007/s10096-021-04224-3
13. *Quan-Xin Long, Xiao-Jun Tang, Qiu-Lin Shi* i inni. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Nat Med 2020; 26, 1200–04, doi: 10.1038/s41591-020- 0965-6
14. *Rastawicki W, Rokosz-Chudziak N.* Charakterystyka oraz ocena przydatności serologicznych testów w diagnostyce zakażeń wywoływanych przez koronawirus SARS--CoV-2 na podstawie dostępnych danych producentów i przeglądu piśmiennictwa. Przegl Epidemiol 2020;74: 49-68.
15. *Rastawicki W. Płaza K.* Poziom ochronnych przeciwciał poszczepiennych u pracowników NIZP-PZH po podaniu szczepionki firmy Pfizer przeciwko COVID-19. Przegl Epidemiol 2021;75: 3-13

16. *Rastawicki W, Płaza K, Pietrusiński A*. Ocena przydatności szybkich, kasetkowych testów immunochromatograficznych w serologicznej diagnostyce COVID-19. Med Dośw Mikrobiol 2021 (w druku)
17. *Röltgen K, Powell AE, Wirz OF* i inni. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. Sci Immunol 2020; 5(54) doi: 10.1126/sciimmunol.abe0240
18. *Vashist SK*. In *vitro* diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. Diagnostics 2020, 10, 202; doi:10.3390/ diagnostics10040202.
19. *Xiangyu C, Zhiwei P, Shuai Y* i inni. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. Signal Transduction and Targeted Therapy 2020; 5: 1-6

Otrzymano: 30 VIII 2021
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy.

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2021,73: 53-69 https://doi.org/10.32394/mdm.73.05

Cefalosporynazy AmpC u *Escherichia coli*

AmpC cephalosporinases in *Escherichia coli*

Magdalena Anna Nowakowska

[1]Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Warszawa

Pałeczki *Escherichia coli* stanowią istotny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych. Znaczącym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje jest ich narastająca oporność na antybiotyki z grupy β-laktamów. Jednym z najistotniejszych mechanizmów oporności na antybiotyki β-laktamowe jest wytwarzanie β-laktamaz. Oporność na cefalosporyny III generacji jest głównie warunkowana wytwarzaniem przez szczep β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL i/lub cefalosporynaz AmpC. Wytwarzanie cefalosporynaz AmpC może być uwarunkowane obecnością genów *ampC* chromosomowych jak i kodowanych plazmidowo. U *E. coli* ekspresja genów *ampC* może być warunkowana konstytutywną ekspresją chromosomowych genów *ampC* na niskim poziomie. Szczepy te nadal pozostają wrażliwe na antybiotyki β−laktamowe. Jednak, na skutek pojawienia się mutacji w rejonie promotorowym *ampC*, coraz częściej pojawiają się szczepy *E. coli*, u których dochodzi do podwyższenia poziomu ekspresji chromosomowych genów *ampC*. Wzrasta także znaczenie kodowanych plazmidowo cefalosporynaz typu AmpC - pAmpC (ang. *plasmid-mediated AmpC β−lactamase*). Ten mechanizm oporności jest istotny ze względu na potencjał szybkiego rozprzestrzeniania, ponieważ kodujące je geny są zwykle przenoszone na ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy. W pracy podjęto próbę przeglądu i charakterystyki mechanizmów oporności związanych z wytwarzaniem cefalosporynaz typu AmpC u klinicznych izolatów *E. coli.*

Słowa kluczowe: *Escherichia coli, chromosomalnie kodowane cefalosporynazy typu AmpC, plazmidowo-kodowane cefalosporynazy typu AmpC*

ABSTRACT

Escherichia coli is an important pathogen causing nosocomial infections. A significant problem in the treatment of infections caused by these microorganisms is their increasing

resistance to β-lactam antibiotics, including third and fourth generation cephalosporins. The production of β-lactamases enzymes such as extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) and AmpC β-lactamases is among the main mechanisms for resistance to third generation cephalosporins. The genes encoding AmpC cephalosporinases are chromosomal (cAmpC) or plasmid-mediated (pAmpC). In *E. coli*, the expression of the *ampC* genes may be conditioned by the constitutive expression of low level *ampC* chromosomal genes. These strains remain susceptible to β-lactam antibiotics. However, mutations in the promoter region of the *ampC* may result in increased level of expression of chromosomal *ampC* genes. This can leads to resistance to cephalosporins. Resistance to cephalosporins in *E. coli* can be also associated with plasmid-mediated AmpC β−lactamases (pAmpC). In *E. coli* the presence of one or more plasmid-mediated AmpC β−lactamases along with the neglible expression of chromosomal encoded AmpC enzyme can leads to resistance to broad-spectrum cephalosporins. This review is focused on a resistance mechanisms associated with the production of AmpC cephalosporinases in clinical *E. coli* isolates.

Key words: *Escherichia coli, chromosomal encoded cephalosporinases AmpC, plasmid-mediated AmpC β−lactamases*

WSTĘP

Escherichia coli, pałeczka okrężnicy, stanowi element flory fizjologicznej jelit człowieka i zwierząt, u których może wywoływać zakażenia oportunistyczne. Jest jednym z dominujących czynników etiologicznych zakażeń zarówno szpitalnych, jak i pozaszpitalnych. *E. coli* jest jednym z głównych czynników wywołujących zakażenia układu pokarmowego u ludzi. Ponadto, *E. coli* jest jednym z głównych czynników etiologicznych wywołujących zakażenia układu moczowego. Szacuje się, że jest odpowiedzialna za ok. 70% - 80% zakażeń układu moczowego – UTI (10, 59, 88). U chorych hospitalizowanych, *E. coli* może być czynnikiem etiologicznym zapalenia płuc, zapalenia otrzewnej, zapalenia dróg żółciowych oraz zakażenia ran. W warunkach szpitalnych, pałeczki *E. coli* mogą być przyczyną zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków. Ponadto, u osób hospitalizowanych, pałeczki *E. coli* mogą wywoływać ciężkie zakażenia szpitalne tj. bakteriemia oraz posocznica (27, 50).

Jak wynika z danych zgromadzonych przez EARS-Net, znaczącym problemem w terapii zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Enterobacterales*, w tym *E. coli*, jest ich narastająca oporność m.in. na antybiotyki β−laktamowe (28). Badania prowadzone w wielu krajach wskazują, że wraz ze wzrostem stosowania w lecznictwie antybiotyków β−laktamowych, obserwuje się wzrost częstości występowania pałeczek *Enterobacterales* wytwarzających β−laktamazy. W pracy podjęto próbę przeglądu i charakterystyki mechanizmów oporności związanych z wytwarzaniem cefalosporynaz typu AmpC u klinicznych izolatów *E. coli.*

ANTYBIOTYKI STOSOWANE W ZAKAŻENIACH PAŁECZKAMI *E. COLI*

W praktyce klinicznej w leczeniu zakażeń pałeczkami *E. coli* najczęściej stosowane są antybiotyki β-laktamowe, aminoglikozydy, glicylcykliny (tygecyklina), sulfonamidy, polimyksyny (kolistyna), fluorochinolony, fosfomycyna (27).

Antybiotyki β−laktamowe stanowią najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę antybiotyków stosowaną w terapii niemal wszystkich rodzajów zakażeń o rozległej etiologii (13, 27, 43, 56). Aktywność przeciwbakteryjna antybiotyków β-laktamowych dotyczy zarówno bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych (13, 27, 43). β-laktamy stanowią jedną z grup antybiotyków najczęściej stosowanych w terapii. Według danych Bush i Bradford (13), w Stanach Zjednoczonych, ok. 65% antybiotyków stosowanych dożylnie stanowią β-laktamy.

Ze względu na częste stosowanie tej grupy antybiotyków obserwuje się wyraźne narastanie lekooporności i znaczne zróżnicowanie jej mechanizmów, w dużej mierze zależnych od struktury i właściwości poszczególnych grup antybiotyków β-laktamowych.

Wzrastająca oporność bakterii na antybiotyki stosowane w lecznictwie stanowi jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny. Dane zebrane przez EARS-Net wskazują, że w wielu krajach Europy, w tym także w Polsce, wyraźnie wzrasta odsetek szczepów izolowanych z zakażeń inwazyjnych opornych na cefalosporyny III generacji. Z zestawienia danych z 2016 r. i 2018 r. wśród izolatów z naszego kraju zaobserwowano iż u *E. coli* odsetek opornych izolatów wzrósł z 13,7 % do 17,6 % (28).

OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI β-LAKTAMOWE U PAŁECZEK GRAM-UJEMNYCH ZWIĄZANA Z WYTWARZANIEM β-LAKTAMAZ

Najbardziej istotnym mechanizmem oporności pałeczek Gram-ujemnych na antybiotyki β-laktamowe jest wytwarzanie β-laktamaz. Hydrolizują one wiązanie amidowe w pierścieniu β-laktamu, inaktywując w ten sposób jego aktywność. Jest to najistotniejszy mechanizm oporności na antybiotyki β-laktamowe u Gram-ujemnych pałeczek *Enterobacteriaceae* (14, 43, 56, 61).

U bakterii Gram-ujemnych, warunkujące wytwarzanie β-laktamaz geny *bla* mogą być zlokalizowane w chromosomie lub w plazmidach. β-laktamazy chromosomowe, to tak zwane β-laktamazy gatunkowo-specyficzne, wytwarzane przez większość pałeczek Gram-ujemnych. Przykładem są należące do klasy C β-laktamaz, cefalosporynazy AmpC, występujące m.in. u pałeczek *Enterobacterales*. Enzymy te posiadają szeroki zakres substratów, obejmujący penicyliny, większość cefalosporyn oraz monobaktamy (15, 56).

Wraz z wprowadzeniem do lecznictwa β-laktamów oraz nowych ich rodzajów i generacji, nastąpiła mobilizacja chromosomowych genów β-laktamaz oraz ich horyzontalne rozprzestrzenianie się - HGT (ang. *Horizontal Gene Transfer*) (15). Kluczową rolę w mobilizacji i rozprzestrzenianiu się genów *bla* odgrywają ruchome elementy genetyczne tj.: plazmidy, transpozony, integrony, moduły transpozycyjne, kasety genowe czy sekwencje insercyjne (15, 56).

Do najistotniejszych plazmidowo-kodowanych β-laktamaz wytwarzanych przez pałeczki *Enterobacterales* należą: β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym

ESBL (*ang. extended-spectrum β−lactamases*); karbapenemazy klasy A należące do rodziny KPC (ang. *Klebsiella peneumoniae carbapenemase*); metalo-β-laktamazy klasy B (MBL; ang. *metallo-β−lactamases*); karbapenemazy klasy D – enzymy CHDL (*ang. carbapenem-hydrolyzing class D β−lactamases)* oraz plazmidowo-kodowane cefalosporynazy AmpC (pAmpC) (12, 15).

CEFALOSPORYNAZY

Większość pałeczek *Enterobacterales* wytwarza chromosomowo kodowane, swoiste dla danego gatunku cefalosporynazy AmpC. Przykładem mogą być cefalosporynazy, wytwarzane przez pałeczki *Citrobacter* sp. (54), *Enterobacter* sp. (33), *Morganella morganii* (4)*, Serratia marcescens* (70), *Hafnia alvei* (35, 90), *Aeromonas* sp. (17, 95), *Yersinia enterocolitica* (84) czy *Pseudomonas* sp. (58).

Cefalosporynazy AmpC, należą do klasy C według klasyfikacji Ambler oraz do grupy 1 według klasyfikacji Bush'a. Charakteryzują się szerokim spektrum substratowym, obejmującym penicyliny, cefamycyny, oksyimino-cefalosporyny i monobaktamy (46, 91, 96). Wytwarzanie AmpC hamowane jest przez specyficzne inhibitory tj. kloksacylina, kwas 3–aminophenyloboronowy. Enzymy te, nie są wrażliwe na działanie inhibitorów ESBL tj. kwasu klawulanowego (56, 96).

Antybiotyki β-laktamowe w różnym stopniu mogą wpływać na indukcję wytwarzania cefalosporynaz. Silnymi induktorami wytwarzania AmpC i zarazem dobrymi substratami dla nich są: benzylopenicyliny, ampicylina, amoksycylina oraz zaliczane do cefalosporyn I generacji – cefaleksyna i cefazolina. Cefoksytyna oraz imipenem również należą do silnych induktorów AmpC, są jednak słabiej hydrolizowane niż leki wymienione wcześniej. Do słabych induktorów i zarazem słabych substratów AmpC zaliczyć można cefotaksym, ceftriakson, ceftazydym, cefuroksym, piperacilinę oraz aztreonam. Jednak, leki te mogą być wydajnie hydrolizowane gdy wytwarzana jest odpowiednia ilość enzymu AmpC (46, 55). AmpC wykazują małą aktywność względem cefepimu, cefpiromu oraz karbapenemów. Inhibitory β-laktamaz ESBL takie jak kwas klawulanowy, nie hamują AmpC, mogą natomiast działać jako induktory ekspresji AmpC (46).

Poziom ekspresji chromosomowych cefalosporynaz u różnych gatunków bakterii może być zróżnicowany. Na przykład, *E. coli* i *Acinteobacter* sp. wytwarzają cefalosporyznazy stale, w sposób konstytutywny, na niskim poziomie. Ten sposób ekspresji β-laktamaz AmpC nie daje dzikim szczepom oporności na antybiotyki β-laktamowe w stężeniach terapeutycznych. U większości gatunków pałeczek Gram-ujemnych, np. *E. cloacae*, *C. freundii* czy *P. aeruginosa* ekspresja cefalosporynaz ma charakter indukowany, zależny od obecności induktora, jakim jest antybiotyk β-laktamowy (46).

PLAZMIDOWO-KODOWANE CEFALOSPORYNAZY TYPU AMPC

Od wielu lat wzrasta znaczenie kodowanych plazmidowo cefalosporynaz AmpC (pAmpC - *ang. plasmid-mediated AmpC β−lactamase*; ACBL - *ang. acquired AmpC--type β−lactamase*) (46, 53, 62, 66, 73, 79, 80). Znajdujące się na ruchomych elementach geny bla_{ampC} kodujące heterogenną grupę enzymów, wywodzą się z chromosomowego DNA: *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* i *Aero-*

monas sp. (46, 89). Jak wynika z danych piśmiennictwa, w ostatnich latach wzrasta udział pAmpC u gatunków, które naturalnie nie wytwarzają cefalosporynaz AmpC (tj. nie posiadają chromosomowych AmpC). Plazmidowo-kodowane cefalosporynazy AmpC najczęściej występują u *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* czy *Proteus mirabilis* (29, 53, 62, 63, 73, 80).

Spektrum substratowe enzymów pAmpC jest zbliżone do chromosomowych cefalosporynaz. Niektóre enzymy pAmpC, np. ACC, mniej wydajnie hydrolizują cefoksytynę. W Niemczech, w 1999 r. *Bauernfeind* i wsp. (8) po raz pierwszy opisali izolat *K. pneumoniae* KUS wytwarzający enzymy pAmpC należące do rodziny ACC (ACC-1). Co ciekawe izolat ten, *in vitro* wykazywał wrażliwość na cefoksytynę i posiadał wartość MIC cefoksytyny równą 4 μg/ml. W następnych latach, fonemem wrażliwości bądź obniżonej wrażliwości na cefoksytynę u izolatów posiadających enzymy ACC obserwowali także inni badacze (11, 36, 65, 69). Spektrum substratowe enzymów pAmpC może być poszerzone o słabe substraty. Przykładowo, wyniki badań Li i wsp. (53) wskazują, iż oporność na ceftazydym i cefotaksym, antybiotyki które nie są najlepszymi substratami dla AmpC, występowała odpowiednio u 94% i 83% izolatów *E. coli* wytwarzających pAmpC, podczas gdy u izolatów wytwarzających chromosomalnie kodowane AmpC oporność na te leki wynosiła odpowiednio 12% i 14%. Co więcej, jak wskazują dane piśmiennictwa (26, 75), niektóre warianty enzymów pAmpC np. CMY-33 czy CMY-44 mogą wykazywać zdolność do hydrolizy cefepimu.

W 1989 roku, *Bauernfeind* i wsp. (9) scharakteryzował pierwszą plazmidowo-kodowaną cefalosporynazę (pAmpC) znalezioną u *K. pneumoniae*. Enzym ten nazwano CMY-1, jego nazwa była związana z aktywnością hydrolityczną względem cefamycyn. Analiza sekwencji nukleotydowej CMY-1 wykazała ponad 80% podobieństwo do sekwencji nukleotydowej chromosomalnego genu *ampC A. hydrophila* (9). W 1990 roku, Papanicolaou i wsp. opisali plazmidowo-kodowaną cefalosporynazę MIR-1 warunkującą oporność na α-metoksy- i oksyimino-β-laktamy. Wynik porównawczej analizy sekwencji nukleotydowej badanego enzymu MIR-1 w 99% wykazywał podobieństwo do sekwencji nukleotydowej chromosomalnego genu *ampC E. cloacae* (72). W kolejnych latach nabyte geny AmpC były znajdowane w genomach różnych gatunków bakterii. W 1993 roku Horii i wsp (42) opisali cefalosporynazę pAmpC należącą do rodziny MOX-1 zlokalizowaną na plazmidzie *K. pneumoniae*, pierwotnie wywodzącą się z chromosomu *A. hydrophila*. W 1997 roku opisano geny pAmpC należące do rodziny DHA-1, znalezione na plazmidzie *S. enetriditis*, a pierwotnie pochodzącą z chromosomalnego DNA *M. morganii* (5). W 1997 r., Bradford i wsp. na plazmidzie *K. pneumoniae* zidentyfikowali nabyte geny bla_{ACT-1}, które pierwotnie zlokalizowane były w chromosomie *E. asburiae* (6).

Grupa pAmpC obejmuje enzymy należące do jednej z kilku rodzin, wyodrębnionych na podstawie różnic w sekwencjach nukleotydowych genów *bla* tj. CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX i DHA. Te najczęściej występujące należą do rodzin CMY, DHA i FOX (20, 25, 31, 64, 66, 73, 79, 85).

Plazmidowo-kodowane cefalosporynazy AmpC są białkami o wielkości od 30 do 42 kDa. β-laktamazy te najczęściej posiadają punkt izolelektryczny (pI) mieszczący się w granicach 6.4 – 9.4. pAmpC należące do rodziny FOX charakteryzują się punktem izolelektrycznym w zakresie 6.4 -7.2 (46, 74).

Od lat 90-tych notuje się wzrastający udział plazmidowo-kodowanych AmpC u *Enterobacterales* (53, 62, 66, 73, 80, 79). Najlepiej poznane i scharakteryzowane są, wywodzące się z chromosomalnie kodowanych cefalosporynaz *Citrobacter freundii* geny z rodziny CMY np. CMY-2, -4, -12, -14, -15 czy *Aeromonas hydrophila* np. CMY-1, -8, -9, -10, -19, które to według piśmiennictwa najczęściej występują u *P. mirabilis*, *E. coli* i *K. pneumoniae*. Zaś enzymy z rodziny DHA najczęściej występują u *K. pneumoniae*. Według danych piśmiennictwa, wariant CMY-2 jest najbardziej rozprzestrzeniony geograficznie (20, 25, 31, 66, 73, 85).

W Polsce, nabyte geny warunkujące wytwarzanie cefalosporynaz typu AmpC należących do rodzin CMY i DHA zostały zidentyfikowane m.in. u *P. mirabilis, E. coli* oraz *K. pneumoniae* (3, 29, 45, 57, 67). U izolatów *E. coli* stwierdzono występowanie genów pAmpC warunkujących wytwarzanie m.in. CMY-2, CMY-4, CMY-15, i DHA (1, 3, 29, 45, 67). Nabyte cefalosporynazy typu AmpC, należące do rodziny CMY (np. CMY-4, -12, -14 i -15), zostały zidentyfikowane w chromosomie izolatów *P. mirabilis*. Według badań przeprowadzanych przez Empel i wsp. najczęściej obserwowany był wariant CMY-15 (29, 57).

REGULACJA EKSPRESJI CEFALOSPORYNAZ TYPU AmpC

Podobnie jak cefalosporynazy naturalne, nabyte enzymy AmpC wykazują dwa rodzaje ekspresji, tj. indukcyjną bądź konstytutywną. Przykładowo, enzymy AmpC należące do rodziny DHA-1, DHA-2, ACT-1 czy CMY-13 są przeważnie eksprymowane w wyniku indukcji (ekspresja indukcyjna), podczas gdy CMY, MIR wytwarzane są zazwyczaj w sposób konstytutywny. U gatunków naturalnie posiadających geny *ampC*, w regulacji ich ekspresji znaczącą rolę odgrywają geny *ampR*, *ampD* oraz *ampG*. AmpR należy do czynników regulacyjnych transkrypcji, jego funkcją jest m.in. aktywacja transkrypcji genów *ampC*. Drugi ważny czynnik regulacyjny AmpD, kodowany jest przez gen *ampD*. Mutacje w genach *ampD* mogą prowadzić do ekspresji genów *ampC* na wysokim poziomie w sposób konstytutywny bądź indukcyjny. Warto zaznaczyć, że poziom ekspresji plazmidowo-przenoszonych genów *ampC* może mieć różny charakter, w zależności od tego czy gen *ampC* uległ przeniesieniu wraz z genami otaczającymi (np. genem *ampR*) (16, 51, 64,76, 83, 89). Na przykład, *Reisbig* i wsp. (76), w swoich badaniach, że u mutanta *E. coli* AmpD^{-} wytwarzającego ACT-1 (*E. coli* ΔpACT-1), stwierdził od 2- do 16-krotny wzrost wartości MIC dla β-laktamów. Dane literaturowe wskazują, że poziom ekspresji genów *ampC*, w tym plazmidowo-przenoszonych genów *ampC*, może być bardzo zróżnicowany i zależeć od różnych czynników. *Reisbig* i wsp. (76), w przeprowadzonych badaniach, stwierdzili, że poziom ekspresji plazmidowych genów, zarówno indukowanych ($bla_{\text{ACT-1}}$), jak i konstytutywnie eksprymowanych ($bla_{\text{MIR-1}}$) jest odpowiednio 33 i 95 razy wyższy w porównaniu do chromosomalnie kodowanych genów *ampC* szczepu *Enterobacter cloacae* o dzikim fenotypie. Co więcej, badacze Ci odnotowali zwiększoną liczbą kopii genów *ampC* na plazmidzie (2 kopie genu $bla_{\text{ACT-1}}$ i 12 kopi genu $bla_{\text{MIR-1}}$). Ponadto, badacze Ci stwierdzili, że, stosunek (ratio) poziomu ekspresji genów do liczby kopii *ampC* dla $bla_{\text{ACT-1}}$ wynosił 17 zaś dla $bla_{\text{MIR-1}}$ wynosił 8. Dodatkowo, wyższy poziom ekspresji genów *ampC*, Reisbig i wsp. (76, 77), wiązali z mutacjami w sekwencji promotorów i genetyczną rearanżacją rejonu promotorowego w poszczególnych badanych genach.

Wyniki przytoczonych badań pokazują, że poziom ekspresji genów *ampC* może być bardzo zróżnicowany i zależeć od więcej niż jednego czynnika. Może to przekładać się na różny stopień oporności na antybiotyki β−laktamowe. Według *Ding* i wsp. (25) przeniesienie plazmidu zawierającego geny z rodziny DHA-1 z *K. pneumoniae* i *E. coli* do szczepu biorcy *E. coli* J53Az^R skutkowało 16-32 wzrostem wartości MIC cefoksytyny. Zjawisko to obserwowane było także przez innych badaczy (82, 85). Jest ono niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż znacznie obniża możliwości terapeutyczne i sprzyja rozpowszechnianiu szczepów, w tym MDR (*Multidrug Resistance*) w środowisku szpitalnym.

OPORNOŚĆ TYPU AmpC U IZOLATÓW *E. COLI*

U *Escherichia coli* ekspresja genów *ampC* może być warunkowana trzema mechanizmami: konstytutywną ekspresją chromosomowych genów *ampC* na niskim poziomie; podwyższonym poziomem ekspresji chromosomowych genów *ampC* (hiperprodukcja) oraz wytwarzaniem nabytych β−laktamaz AmpC. W dzikich szczepach *E. coli* ekspresja chromosomowych genów *ampC* zachodzi w sposób konstytutywny, na niskim poziomie i podlega regulacji poprzez atenuację (47). Szczepy te nadal pozostają wrażliwe na antybiotyki β−laktamowe. Jednak, na skutek pojawienia się mutacji (np. w obrębie promotorów) pojawiają się szczepy *E. coli*, u których dochodzi do podwyższenia poziomu ekspresji chromosomowych genów *ampC*. U mutantów ekspresja genów *ampC* ma charakter konstytutywny, lecz na wyższym poziomie. Według niektórych autorów (47, 48) szczepy te mogą wykazywać oporność na wiele β−laktamów, w tym cefalosporyny trzeciej generacji.

Stosunkowo dawno wykazano, że w wyniku zmiany odległości pomiędzy sekwencją -35 box TTGTCA i sekwencją -10 box TACAAT w rejonie promotorowym *ampC E. coli*, może dochodzić do modyfikacji miejsca inicjacji transkrypcji i wzrostu poziomu ekspresji genów *ampC* (49, 71). Jednym z pierwszych opisanych mechanizmów nadekspresji genów *ampC* (hiperprodukcji) u *E. coli* była mutacja w rejonie promotora polegająca na insercji, która spowodowała zwiększenie odległości pomiędzy rejonem promotora -35 box TTGTCA a -10 box TACAAT, z 16 do 17 pz (40). Inne dane literaturowe opisywały insercje powodujące zwiększenie tego rejonu do 18 pz (68, 93). Przykładami omawianych wyżej wymienionych mutacji polegających na insercji są np. insercje w pozycji -13.1 i -13.2 (68). W rejonie promotorowym/atenuatora genów *ampC* może dochodzić do wbudowania sekwencji inercyjnych. Sekwencje te mogą prowadzić do powstania nowych „silnych" sekwencji promotorowych np. -35 box, bądź mogą przenosić inne silne sekwencje promotorowe. Przykładami takich sekwencji insercyjnych są: IS*2*, IS9*11* czy IS*10* (49, 68).

Ponadto, w rejonie promotorowym genów *ampC* mogą występować tzw. mutacje „znaczące", których częstym przykładem mogą być substytucje nukleotydów w pozycjach: -42 (C→T), -32 (T→A) czy -11 (C→T). Mutacja w pozycji -42 prowadzi do powstania alternatywnego regionu promotora -35 box. Mutacja -32 prowadzi do powstania nowego consensus promotora -35 TTGTCA box (zmiana na TTGACA), mutacja -11 prowadzi do powstania nowego consensus promotora -10 TACAAT box (zmiana na TATAAT), co w konsekwencji prowadzi do wzmocnienia siły/aktywności promotora (68, 93). Inne przykłady mutacji spotykanych w rejonie regulatorowym genów *ampC* dotyczą rejonu

spejsera pomiędzy -35 box i -10 box (21, 38, 39, 52, 53, 68). Co więcej, mutacjom „znaczącym", często towarzyszą dodatkowe mutacje w pozycjach: -88, -82, -18, -1 bądź +58 (21, 38, 39, 52, 53, 68, 93). Ponadto, mutacje polegające na np. na substytucji nukleotydu, mogą również występować w rejonie atenuatora transkrypcji genów *ampC*. Mutacje te, wpływają na destabilizację mRNA struktury „szpilki do w włosów", co w konsekwencji może prowadzić do wzrostu ekspresji genów *ampC* (47). Według niektórych autorów (93), pojedyncze mutacje występujące w rejonie atenuatora, nie wpływają w sposób znaczący na wzrost ekspresji genów *ampC*.

Zdaniem niektórych autorów (39, 92), pomimo znaczącego zwiększenia poziomu ekspresji genów *ampC*, będącego skutkiem mutacji w obrębie rejonu promotora, nie obserwowali znaczących zmian w wartości MIC badanych cefalosporyn. Może to świadczyć o tym że, same zmiany poziomu ekspresji *ampC* nie zawsze wystarczają do efektywnej hydrolizy tzw. trudnych substratów. Sugeruje to, że poziom ekspresji genów chromosomalnych *ampC* może być bardzo zróżnicowany. Tak też *in vitro*, obok szczepów wysokoopornych na cefalosporyny (hiperprodukcja AmpC) mogą występować szczepy z zaledwie obniżoną wrażliwością.

ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ GENÓW *ampC*

Geny warunkujące wytwarzanie pAmpC mogą być zlokalizowane na plazmidach koniugacyjnych (42, 81, 87). Dla przykładu, geny z rodziny DHA-1 znaleziono na plazmidzie koniugacyjnym pSAL1 *Salmonella* enteritidis (5, 32), geny z rodziny FOX-1 na plazmidzie koniugacyjnym pGLK1 *K. pneumoniae* (37). Według danych literaturowych, niektóre plazmidy przenoszące geny *ampC* mogą być niezdolne do koniugacji lecz mogą być one mobilizowane przez inne plazmidy koniugacyjne lub opornościowe.

Dane piśmiennictwa wskazują, iż oporność na cefoksytynę i cefalosporyny trzeciej generacji, związana z mechanizmem pAmpC, może być przenoszona na drodze koniugacji (7, 23, 34, 60, 81, 82, 86). Na przykład, *Singtohin* i wsp. (86), w swoich badaniach wykazali iż plazmidy niosące geny bla_{CMY-2} u ok. 54% badanych izolatów *E. coli* i *K. pneumoniae* były zdolne do koniugacyjnego transferu. We Francji *Decré* i wsp. (23) wykazali, że ze szczepów dawców posiadających geny bla_{CMY-2} lub bla_{CMY-4} na drodze koniugacyjnego transferu do biorcy zostaje przeniesiona oporność na cefoksytynę, cefotkasym i ceftazydym. Mając na uwadze spostrzeżenia innych autorów można przypuszczać, iż oporność na cefamycyny i cefalosporyny III generacji, związana z nabytym mechanizmem AmpC może być łatwo przekazywana do innych bakterii. Zjawisko to jest niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia, gdyż horyzontalne przeniesienie może skutkować nabyciem przez szczep dziki wysokiej oporności. Skutkiem czego, może być eliminacja wielu antybiotyków β−laktamowych, jako przydatnych w terapii. Ponadto, należy podkreślić, że horyzontalny transfer genów sprzyja rozpowszechnianiu szczepów, w tym MDR (ang. *Multidrug Resistance*) w środowisku szpitalnym. Co więcej, na ruchomych elementach genetycznych, w których zlokalizowane są geny warunkujące wytwarzanie pAmpC mogą znajdować się i podlegać wspólnej selekcji geny determinujące wytwarzanie innych β-laktamaz tj. ESBL oraz geny warunkujące oporność na inne grupy antybiotyków, jak fluorochinolony czy aminoglikozydy (3, 30, 78, 79).

Wielkość plazmidów przenoszących geny pAmpC, mieści się w zakresie od ok. 7 do ok. 400 kb (2, 3, 63, 74, 78, 87). Plazmidy przenoszące geny *ampC* mogą należeć do różnych grup niezgodności Inc (ang. *incompability*) np. IncFII czy IncI. Geny pAmpC znaleziono m.in. na plazmidach o szerokim zakresie gospodarza. Warunkuje to rozprzestrzenianie genów *ampC* nawet pomiędzy szczepami należącymi do różnych gatunków. Wyniki badań *Alonso* i wsp. (2) wskazują, że u izolatów *E. coli* posiadających geny CMY, najczęściej występowały plazmidy należące do grupy niezgodności IncI1, zaś u izolatów posiadających geny DHA - IncF. Ponadto, wyniki analiz tych badaczy wykazały, że geny z rodziny CMY mogą być przenoszone na plazmidach o wielkości 40-185 kpz, zaś geny z rodziny DHA na dużych plazmidach o wielkości 70-185 kpz. Według obserwacji autorów (2, 19, 63, 78, 86), u *E. coli*, geny CMY zlokalizowane są w dużych plazmidach, o wielkościach w zakresie od ok. 40 do ponad 300 kpz. Na przykład, w Hiszpanii, *Alonso* i wsp. (2) u *E. coli*, zidentyfikowali geny z rodziny CMY zlokalizowane na plazmidach o wielkości od ok. 40 kpz do ok. 185 kpz. Także w Hiszpanii, *Mata* i wsp. (63), wykazali obecność genów bla_{CMY} u izolatów *E. coli* w dużych plazmidach o wielkościach od ok. 40 do ponad 400 kpz. Ponadto, wyniki badań uzyskane przez innych autorów (2, 19, 30, 63, 78) wskazują że, geny z rodziny CMY u *E. coli* często zlokalizowane są w dużych plazmidach, należących do plazmidowych grup niezgodności: IncI, IncF, IncFII i IncK. Na przykład, Mata i wsp. (63) w swoich badaniach wykazali że wśród *E. coli* CMY(+) kolekcjonowanych z terenu Hiszpanii, do najczęściej występujących replikonów plazmidowych należały: A/C, I1, K, F, FIA czy FIB. W Polsce u izolatów *E. coli* stwierdzono występowanie genów pAmpC warunkujących wytwarzanie CMY-2, CMY-4 w plazmidach należących do grupy niezgodności IncX3 i IncC (3, 45).

Istotną rolę w rozprzestrzenianiu lekooporności u pałeczek *Enterobacterales* odgrywają mobilne elementy genetyczne takie jak integrony i kasety genowe, często zlokalizowane na plazmidach koniugacyjnych bądź transpozonach. W obrębie integronów, u lekoopornych izolatów *Enterobacterales*, identyfikowano m.in. geny warunkujące oporność na antybiotyki β-laktamowe, aminoglikozydy czy trimetoprim. Wśród pałeczek *Enterobacterales* najpowszechniej występują integrony klasy 1 (18, 24, 44). Według danych piśmiennictwa, geny warunkujące pAmpC mogą być mobilizowane do transferu na mobilnych elementach takich jak transpozony czy integrony. Nabyte geny *ampC* tj.: bla_{DHA-1}, bla_{FOX-4}, bla_{CMY-1}, bla_{CMY-8} czy bla_{MOX-1} zostały znalezione na integronie klasy 1 (74, 94). Wyniki badań przeprowadzonych przez *Mokracką* i wsp. (67) wskazują, że w Polsce, w latach 1999-2001 oraz 2008-2010, nastąpił wzrost częstości występowania izolatów *E. coli* posiadających integrony z 31,6% do 80,7%. Jednocześnie *Mokracka* i wsp., w prowadzonych badaniach zaobserwowali wzrost częstości występowania pałeczek *E. coli* wykazujących oporność na różne grupy antybiotyków oraz wzrost częstości występowania genów kodujących wytwarzanie β-lakatamaz. Co więcej, wchodząca w skład kompleksu integronu klasy 1, sekwencja insercyjna IS*CR*, odpowiada m.in. za transfer genów należących do rodziny DHA i MOX. Zaś sekwencja insercyjna IS*26*, składająca się z genu transpozazy *tnpA*, odpowiada m.in. za transfer genów z rodziny CMY (np. CMY-13) wraz z przylegającym czynnikiem regulującym transkrypcję - genem *ampR* (46, 74). *Verdet* i wsp. (94) w swoich badaniach wykazali, iż sekwencja insercyjna IS*26* związana jest także z mobilizacją i transferem genów bla_{DHA-1}. Potwierdzają to także wyniki uzyskane

przez *Zamorano* i wsp. (97), wskazujące, iż u 86% izolatów *Enterobacteriaceae* posiadających geny bla_{DHA} były związane z sekwencją insercyjną IS*26*.

Za rozprzestrzenianie się pierwotnie chromosomalnie-kodowanych genów *ampC* odpowiedzialne są m.in. ruchome elementy genetyczne znajdujące się w plazmidach, takie jak sekwencja insercyjna IS*Ecp1*. IS*Ecp1* związana jest m.in. z transferem wielu wariantów chromosomalnych genów z rodziny CMY oraz niektórych wariantów genów AAC (22, 30, 46). Na przykład, sekwencję IS*Ecp1* znaleziono m.in. w sąsiedztwie genów bla_{CMY-2}, bla_{CMY-4}, $bla_{CMY-7,}$ $bla_{CMY-15,}$ $bla_{CMY-31,}$ bla_{CMY-36} czy bla_{CMY-42} u *K. pneumoniae, E. coli, P. mirabilis* czy *S. enterica* (22, 30, 39, 98). Nabyte geny np. bla_{CMY-2}, bla_{CMY-4}, bla_{CMY-12}, bla_{CMY-14} czy bla_{CMY-36} związane z sekwencją IS*Ecp1* (IS*Ecp1*-bla_{CMY}) zostały znalezione w m.in. w genomie szczepów *P. mirabilis* wyizolowanych na terenie Polski, Włoch i Grecji. W Polsce, sekwencja IS*Ecp1* została znaleziona 106 pz powyżej nabytych genów bla_{CMY-12}, bla_{CMY-4}, bla_{CMY-15} i bla_{CMY-14} u *P. mirabilis* (29, 57). Zaś *D'Andrea* i wsp. (22), określili pozycję IS*Ecp1* 110 pz powyżej nabytych genów bla_{CMY-4}, bla_{CMY-12}, $bla_{CMY-14,}$ bla_{CMY-15}, bla_{CMY-16} czy bla_{CMY-45} wbudowanych w genom *P. mirabilis.* Wyniki zarówno polskich jak i zagranicznych badaczy (22, 57) wskazują, że sekwencja IS*Ecp1* związana jest z m.in. z mobilizacją pierwotnie chromosomalnych genów *ampC Citrobacter freundii* oraz towarzyszących im genów *blc* i *sugE* i wbudowaniem ich w chromosomalne DNA *Proteus mirabilis*. Obecność genów *blc* i *sugE* w genetycznym sąsiedztwie bla_{CMY} została także zidentyfikowana w genomie *Escherichia coli* (30, 41).

PODSUMOWANIE

Oporność na antybiotyki β-laktamowe związana z wytwarzaniem cefalosporynaz AmpC u *Escherichia coli* jest problemem złożonym. U *E. coli* wytwarzanie cefalosporynaz AmpC może być uwarunkowane konstytutywną ekspresją chromosomowych genów *ampC* na niskim poziomie. Na skutek pojawienia się mutacji w rejonie promotorowym *ampC* pojawiają się szczepy *E. coli*, u których dochodzi do konstytutywnego, podwyższonego poziomu ekspresji chromosomalnych genów *ampC*, co sprzyja selekcji izolatów opornych na antybiotyki β-laktamowe, w tym cefalosporyny. Ponadto, istotna jest obecność nabytych β-laktamaz pAmpC z indywidualnym systemem regulacji ekspresji. Geny kodujące pAmpC zwykle są przenoszone na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy, przez co rośnie potencjał szybkiego przekazywania genów warunkujących pAmpC pomiędzy różnymi gatunkami pałeczek *Enterobacterales*.

PIŚMIENNICTWO

1. *Adamus-Białek W., Baraniak A., Wawszczak M.* i inni. The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains. Mol Biol Rep 2018; 45:1055-65.
2. *Alonso N., Miró E., Pascual V.* i inni. Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents 2016; 47: 62-8.

3. *Baraniak A., Machulska M., Żabicka D.* i inni. NDM-PL Study Group. Towards endemicity: large-scale expansion of the NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 lineage in Poland, 2015-16. J Antimicrob Chemother 2019; 74: 3199-204.
4. *Barnaud G., Arlet G., Danglot C., Philippon A.* Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC beta-lactamase of *Morganella morganii*. FEMS Microbiol Lett 1997; 148: 15-20.
5. *Barnaud G., Arlet G., Verdet C.* i inni. Salmonella enteritidis: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2352-8.
6. *Bradford P.A., Urban C., Mariano N.* i inni. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 563-9.
7. *Bauernfeind A., Stemplinger I., Jungwirth R., Giamarellou H.* Characterization of the plasmidic β-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. Antimicrob. Agents Chemother 1996; 40: 221–4.
8. *Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R.* i inni. A Novel Type of AmpC β-Lactamase, ACC-1, Produced by a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Nosocomial Pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1924-31.
9. *Bauernfeind A., Chong Y., Schweighart S.* Extended broad spectrum β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection 1989; 17:316–21.
10. *Bollestad M., Vik I., Grude N., Blix H.S.,* i inni. Bacteriology in uncomplicated urinary tract infections in Norwegian general practice from 2001-2015. BJGP Open 2017; 4:1(4).
11. *Brenwald N.P., Jevons G., Andrews J.* i inni. Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 600-1.
12. *Bush K.* Alarming β-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae.* Curr Opin Microbiol 2010; 13: 558-64. Lub Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. Crit Care 2010; 14:224.
13. *Bush K., Bradford P.A.* β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med 2016; 1:6 (8).
14. *Bush, K., Jacoby G.A., Medeiros A.A.* A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother 1995; 39:1211–1233.
15. *Bush K.* Past and Present Perspectives on β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62 (10).
16. *Carrasco-López C., Rojas-Altuve A., Zhang W.* i inni. Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism. J Biol Chem. 2011; 286: 31714-22.
17. *Chen P.L., Ko W.C., Wu C.J.* Complexity of β-lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. J Microbiol Immunol Infect 2012; 45: 398-403.

18. *Chen C.M., C.L., Wu H.J, Wu L.T.* Genetic characteristic of class 1 integrons in *Proteus mirabilis* isolates from urine samples. Biomedicine (Taipei) 2017; 7: 9.
19. *Chérif T., Saidani M., Decré D.* i inni. Cooccurrence of Multiple AmpC β-Lactamases in *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in Tunisia. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 44-51.
20. *Compain F., Decré D., Fulgencio J.P.* i inni. Molecular characterization of DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates collected during a 4-year period in an intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 80: 159-61.
21. *Corvec S., Prodhomme A., Giraudeau C.* i inni. Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC beta-lactamase belong to phylogenetic group A. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 872-6.
22. *D'Andrea M.M., Literacka E., Zioga A.* i inni. Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2735-42.
23. *Decré D., Verdet C., Raskine L. i wsp*. Characterization of CMY-type beta-lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 681-8.
24. *Deng Y., Bao X., Ji L.* i inni. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 20: 14-45.
25. *Ding H., Yang Y., Lu Q.* i inni. The prevalence of plasmid-mediated AmpC β-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 915-21.
26. *Doi Y., Paterson D.L., Adams-Haduch J.M. i inni*. Reduced susceptibility to cefepime among clinical isolates producing novel variants of CMY-2 β-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3159–61.
27. *Dzierżanowska D.* Antybiotykoterapia praktyczna. Alfa-Medica Press. Wydanie VI. Bielsko-Biała 2018.
28. *EARS-Net Annual Reports*. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2018. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (www.ecdc.europa.eu).
29. *Empel J., Baraniak A., Literacka E.* i inni. Beta-PL Study Group. Beta-PL Study Group: Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2449-54.
30. *Feng Y., Yang P., Xie Y.* i inni. Escherichia coli of sequence type 3835 carrying bla_{NDM-1}, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{CMY-42} and bla SHV-12. Sci Rep 2015; 21: 12275.
31. *Freitas F., Machado E., Ribeiro T.G., Novais Â., Peixe L*. Long-term dissemination of acquired AmpC β-lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 551-8.
32. *Gaillot O., Clément C., Simonet M., Philippon A.* Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 85-7.
33. *Galleni M., Lindberg F.,* i inni. Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae* ampC beta-lactamase genes and their products. Biochem J 1988 Mar 15; 250: 753-60.

34. *Gharout-Sait A., Touati A., Guillard T.* i inni. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enteroba-cteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. Braz J Infect Dis 2015; 19: 187-95.
35. *Girlich D., Naas T., Bellais S.* i inni. Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of *Hafnia alvei* clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistance phenotypes. Antimicrob Agents Chemother 2000 A;44: 3220-3.
36. *Girlich D., Karim A., Spicq C., Nordmann P.* Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 B; 19: 893-5.
37. *Gonzalez Leiza M., Perez-Diaz J.C., Ayala J.* i inni. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from Klebsiella pneumoniae, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 2150-7.
38. *Gude M.J., Seral C., Sáenz Y.,* i inni. Evaluation of four phenotypic methods to detect plasmid-mediated AmpC β-lactamases in clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 2037-43.
39. *Haldorsen B., Aasnaes B., Dahl K.H.* i inni. The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 694-702.
40. *Hawley D. K., McClure W.R.* Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 1983; 11: 2237–55.
41. *Hentschke M., Kotsakis S.D., Wolters M.* i inni. CMY-42, a novel plasmid-mediated CMY-2 variant AmpC beta-lactamase. Microb Drug Resist 2011;17: 165-9.
42. *Horii T., Arakawa Y., Ohta M.* i inni. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed bla_{MOX-1} gene encoding AmpC-type β-lactamase. Gene 1994; 139: 93–8.
43. *Hryniewicz W., Mészáros J.* Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń: Wydaw. Lekarskie PZWL. Warszawa 2001.
44. *Hsu S.C., Chiu T.H., Pang J.C.* i inni. Characterization of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Eschericha coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates isolated from humans and swine in Taiwan. Int J Antimicrobl Ag 2006; 27: 383–91.
45. *Izdebski R., Baraniak A., Żabicka D.* i inni. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. J Antimicrob Chemother. 2018 Mar 1;73(3)
46. *Jacoby G.A.* AmpC β-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22: 161-82.
47. *Jaurin B., Grundstrom T., Edlund T.* i inni. The E. coli β-lactactamase attenuator mediates growth rate- dependent regulation. Nature. 1981;290: 221–5.
48. *Jaurin B., Grundstrom T., Normark S.* Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. EMBO J; 1982; 1: 875–81.
49. *Jaurin B., Normark S.* Insertion of IS2 creates a novel ampC promoter in *Escherichia coli*. Cell 1983;32: 809–16.

50. *Kim K.S.* Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. EcoSal Plus 2016;7(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2015. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0015-201510.
51. *Lee M., Zhang W., Hesek D.* i inni. Bacterial AmpD at the crossroads of peptidoglycan recycling and manifestation of antibiotic resistance. J Am Chem Soc. 2009 131: 8742-3.
52. *Lewis J.A., Moore P.C., Arnold D.L.* i inni. Multi-locus sequence typing of *Escherichia coli* isolates with acquired ampC genes and ampC promoter mutations. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 86(3):265-267.
53. *Li Y.Y., Cassidy F., Salmon A., Keating D.* i inni. Detection and epidemiology of plasmid-mediated AmpC β-lactamase producing *Escherichia coli* in two Irish tertiary care hospitals. J Glob Antimicrob Resist 2015; 3: 242-246.
54. *Lindberg F., Normark S.* Sequence of the *Citrobacter freundii* 0S60 chromosomal ampC beta-lactamase gene. Eur J Biochem 1986; 156: 441-5.
55. *Livermore D.M.* Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 439-45.
56. *Livermore D.M.* β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557–84.
57. *Literacka E., Empel J., Baraniak A.* i inni. Four variants of the Citrobacter freundii AmpC-Type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4136-43.
58. *Lodge J.M., Minchin S.D., Piddock L.J.* i inni. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC beta-lactamase. Biochem J 1990; 272: 627-31.
59. *Malmartel A., Ghasarossian C.* Epidemiology of urinary tract infections, bacterial species and resistances in primary care in France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35: 447-51.
60. *Manageiro V., Ferreira E., Pinto M.* i inni. Two novel CMY-2-type β-lactamases encountered in clinical *Escherichia coli* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 14:12.
61. *Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.* Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN. Wydanie I. Warszawa 2012.
62. *Mata C., Miró E., Riviera A.* i inni. Prevalence of acquired AmpC β-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 472 – 6.
63. *Mata C., Miró E., Alvarado A.* i inni. Plasmid typing and genetic context of AmpC β-lactamases in *Enterobacteriaceae l*acking inducible chromosomal ampC genes: findins from a Spanish hospital 1999-2007. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 115-22.
64. *Meini S., Tascini C., Cei M.* i inni. AmpC β-lactamase-producing *Enterobacterales*: what a clinician should know. Infection 2019; 47: 363-75.
65. *Miró E., Mirelis B., Navarro F.* i inni. *Escherichia coli* producing an ACC-1 class C beta-lactamase isolated in Barcelona, Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 866-7.

66. *Miró E., Agüero J., Larrosa M.N., Fernández A.* i inni. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013; 32: 253-9.
67. *Mokracka J., Oszyńska A., Kaznowski A.* Increased frequency of integrons and β-lactamase-coding genes among extraintestinal *Escherichia coli* isolated with a 7-year interval. Antonie Van Leeuwenhoek 2013; 103: 163-74.
68. *Mulvey M.R., Bryce E., Boyd D.A., Ofner-Agostini M.* i inni. Paton S. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 358-65.
69. *Nadjar D., Rouveau M., Verdet C.* i inni. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. FEMS Microbiol Lett 2000; 187: 35-40
70. *Nomura K., Yoshida T.* Nucleotide sequence of the *Serratia marcescens* SR50 chromosomal ampC beta-lactamase gene. FEMS Microbiol Lett 1990; 58: 295-9.
71. *Olsson O., Bergström S., Lindberg F.P., Normark S. ampC* beta-lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from Shigella. Proc Natl Acad Sci U S A 1983; 80: 7556-60.
72. *Papanicolaou G. A., Medeiros A. A., Jacoby G. A.* Novel plasmidmediated β-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α-methoxy β-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 2200–9.
73. *Park M.J., Kim T.K., Song W.* i inni. An increase in the clinical isolation of acquired AmpC β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Korea from 2007 to 2010. Ann Lab Med 2013; 33: 353-5.
74. *Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A.* Plasmid-determined AmpC-type β-lactameses. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1-11.
75. *Pires J., Taracila M., Bethel C.R.* i inni. In vivo evolution of CMY-2 to CMY-33 β-lactamase in *Escherichia coli* ST131: characterization of an acquired extended-spectrum AmpC (ESAC) conferring resistance to cefepime. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 7483-8
76. *Reisbig M.D., Hossain A., Hanson N.D.* Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of Enterobacter origin. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1141-51.
77. *Reisbig M.D., Hanson N.D.* Promoter sequences necessary for high-level expression of the plasmid-associated ampC betalactamase gene blaMIR-1. Antimicrob Agents Chemother 2004;48: 4177-82.
78. *Ribeiro T.G., Novais Â., Rodrigues C.* i inni. Dynamics of clonal and plasmid backgrounds of *Enterobacteriaceae* producing acquired AmpC in Portuguese clinical settings over time. Int J Antimicrob Agents 2019; 53: 650-6.
79. *Rizi K.S., Mosavat A., Youssefi M.* i inni. High prevalence of bla_{CMY} AmpC betalactamase in ESBL co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates in the northeast of Iran. J Glob Antimicrob Resist 2020; 22: 477-82

80. *Roche C., Boo T.W., Walsh F.* i inni. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 616–8.
81. *Santiago G.S., Gonçalves D., da Silva Coelho I.* i inni. Conjugative plasmidic AmpC detected in *Escherichia coli, Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* human clinical isolates from Portugal. Braz J Microbiol 2020; 51: 1807-12.
82. *Sasirekha B., Shivakumar S.* Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamases Among Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Bangalore. Indian J Microbiol 2012; 52: 174-9.
83. *Schmidtke A.J., Hanson N.D.* Model system to evaluate the effect of *ampD* mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2030-7.
84. *Seoane A., Francia M.V., García Lobo J.M.* Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1049-52.
85. *Shi W.F., Zhou J., Qin J.P.* Transconjugation and genotyping of the plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and extendedspectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae*. Chin Med J 2009; 122: 1092-6.
86. *Singtohin S., Chanawong A., Lulitanond A.* i inni. CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC β-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68: 271-7.
87. *Stapleton, P. D., Shannon K. P., French G. L.* Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 β-lactamase production and loss of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43**:** 1206–10.
88. *Stefaniuk E., Suchocka U., Bosacka K.* i inni. Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016; 35: 1363-9.
89. *Tamma P.D., Doi Y., Bonomo R.A.* i inni. Antibacterial Resistance Leadership Group. A Primer on AmpC Beta-Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-Resistant World. Clin Infect Dis 2019; Mar 6. pii: ciz173. doi: 10.1093/cid/ciz173.
90. *Thomson K.S., Sanders C.C., Washington JA II***.** Ceftazidime resistance in *Hafnia alvei*. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 1375-6.
91. *Thomson K.S.* Extender-spectrum-β-lactamase, AmpC and carbapenemase issues. J Clin Microbiol 2010; 48: 1019-25.
92. *Tracz D.M., Boyd D.A., Bryden L.* i inni. Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 768-72.
93. *Tracz D.M., Boyd D.A., Hizon R.* i inni. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. FEMS Microbiol Lett 2007; 270: 265-71.
94. *Verdet C., Benzerara Y., Gautier V.* i inni. Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the ampC and ampR genes originating from Morganella morganii. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 607-17.

95. *Walsh T.R., Stunt R.A., Nabi J.A.* i inni**.** Distribution and expression of β-lactamase genes among *Aeromonas* spp. J. Antimicrob. Chemother 1997; 40**:** 171-8.
96. *Walther-Rasmussen J., Høiby N.* Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. Can J Microbiol 2002; 48: 479-93.
97. *Zamorano L., Miró E., Juan C.* i inni. Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β-lactamases or carbapenemases from *Enterobacteriaceae*: findings from a multicenter study in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 5260-6.
98. *Zioga A., Whichard J.M., Kotsakis S.D.* i inni. CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 1256-9.

Otrzymano: 27 VIII 2021 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH-Państwowy Instytut Badawczy

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2021,73: 71-100 https://doi.org/10.32394/mdm.73.06

Mikrobiota jelitowa człowieka – jej zróżnicowanie i wpływ na nasze zdrowie

Human gut microbiota – its diversity and impact on our health

Sebastian Wardak

MEDGEN Kamila Czerska i wsp. Sp. K. Warszawa

Przewód pokarmowy człowieka stanowi środowisko życia dla miliardów komórek różnorodnych mikroorganizmów wchodzących w skład ludzkiej mikrobioty. Zastosowanie nowoczesnych technik biologii molekularnej takich jak np. NGS (Next Generation Sequencing) umożliwiło szczegółowe poznanie drobnoustrojów zamieszkujących jelita i badanie ich wpływu na zdrowie człowieka. Mikrobiota jelitowa odgrywa znaczącą rolę w syntezie oraz metabolizmie wielu składników odżywczych i metabolitów, w tym krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), aminokwasów, lipidów, kwasów żółciowych i witamin. Na jej zróżnicowanie wpływa wiele czynników takich jak np. dieta, wiek człowieka, klimat i warunki socjo-ekonomiczne. Gwałtowne zmiany w składzie mikrobioty (zaburzenie homeostazy) mogą prowadzić do dysbiozy – stanu związanego nie tylko z zaburzeniami jelitowymi, ale także z licznymi chorobami pozajelitowymi. Przedmiotem obecnej pracy jest przegląd aktualnych doniesień na temat: technik badawczych stosowanych do analizy mikrobioty, wpływu różnych czynników na jej zróżnicowanie oraz oddziaływania mikrobioty na nasze zdrowie.

Słowa kluczowe: *mikrobiota jelitowa, mikrobiom, dysbioza, SCFA, NGS, 16SrRNA, stany zapalne jelit, zakażenia C. difficile, alergie pokarmowe, rak jelita grubego, celiakia, transfer mikrobioty, probiotyki, prebiotyki.*

ABSTRACT

The human digestive tract is the living environment for billions of cells of various microorganisms that are part of the human microflora. The use of modern molecular biology techniques, such as NGS (Next Generation Sequencing), made it possible to study the microorganisms inhabiting the intestines and to understand their impact on human health. The gut microbiota plays a significant role in the synthesis and metabolism of

many nutrients and metabolites, including short-chain fatty acids (SCFA), amino acids, lipids, bile acids and vitamins. Many factors such as diet, age, climate, and socioeconomic conditions influence the diversity of the microbiota. Rapid changes in the composition of the microbiota (disturbance of homeostasis) can lead to dysbiosis - a condition associated not only with intestinal disorders, but also with numerous extraintestinal diseases. The present work is a review of current reports on: research techniques used to analyze microbiota, the impact of various factors on its diversity and the impact of microbiota on our health.

Key words: *gut microbiota, microbiome, dysbiosis, SCFA, NGS, 16SrRNA, intestinal inflammation, C.difficile infections, food allergies, colorectal cancer, celiac disease, microbiota transfer, probiotics, prebiotics*

WPROWADZENIE

Ostatnie dziesięciolecia były obfite w liczne odkrycia w różnych dziedzinach naukowych. Szczególnie na tym polu wyróżnia się genetyka, gdzie poznano nowe, szybkie i relatywnie tanie techniki analizy materiału genetycznego. Przyczyniły się one do lepszego poznania naszego genomu i ustalenia molekularnych podstaw wielu chorób. Umożliwiły także lepsze zrozumienie otaczającego nas świata istot żywych, w tym niewidocznych gołym okiem mikroorganizmów. Od pierwszych odkryć *Ludwika Pasteura i Roberta Kocha* minęło już prawie 150 lat, jednak dopiero pierwsze dwudziestolecie XXI wieku pozwoliło na scharakteryzowanie mikroorganizmów zamieszkujących nasze ciało. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej stwierdzono, że człowiek stanowi środowisko życia dla miliardów komórek różnorodnych mikroorganizmów. Wszystkie te drobnoustroje stanowią ludzką mikrobiotę nazywaną także mikrobiomem lub mikroflorą. Pomimo wymiennego stosowania w piśmiennictwie naukowym terminów „mikrobiota" i „mikrobiom" terminy te mają inne znaczenia (17). „Mikrobiotą" określa się ogół mikroorganizmów zamieszkujących dane środowisko np. skórę, żołądek czy jelita. Termin „mikrobiom" z kolei wprowadził laureat Nagrody Nobla *Joshua Lederberg* w 2001 roku określając nim zbiór genomów tych drobnoustrojów (51). Dodatkowo stosowany jest jeszcze termin „mikroflora", który związany jest z dawnym przekonaniem o pochodzeniu drobnoustrojów z królestwa roślin. Pomimo, że mikroorganizmy mają niewiele wspólnego z roślinami, termin ten jest bardzo często stosowany zarówno w publikacjach naukowych jak i piśmiennictwie popularnonaukowym. W skład mikrobiomu ludzkiego wchodzą bakterie, archeony, wirusy oraz należące do eukariontów grzyby i pierwotniaki. Organizm człowieka razem z zamieszkującymi go mikroorganizmami stanowi tzw. „superorganizm" (30). W ostatnich latach opublikowano tysiące prac naukowych dotyczących ludzkiej mikrobioty. Wynika z nich olbrzymie bogactwo gatunkowe zamieszkujących organizm człowieka drobnoustrojów oraz ich duży wpływ na nasze zdrowie. Większą część mikrobiomu stanowią bakterie i to one są przedmiotem niniejszego opracowania. W ludzkich jelitach żyje ponad 1000 gatunków bakterii z czego u każdego człowieka wykrywanych jest około 160 różnych gatunków (17, 71, 75). Opublikowane w 2019 roku badania przeprowadzone przez *Almeida* i wsp. wskazują, że poza

wcześniej już opisanymi 553 gatunkami bakteryjnymi, które mogą być wyhodowane w sztucznych warunkach, liczba nowych, niesklasyfikowanych jak do tej pory gatunków bakteryjnych wykrytych w jelitach u ludzi wynosi aż 1952 (2). Według najnowszych szacunków liczba wszystkich komórek bakteryjnych zamieszkujących organizm człowieka dorównuje liczbie komórek naszego ciała (10^13 komórek bakteryjnych) (86). Natomiast liczba unikatowych genów bakteryjnych wchodzących w skład mikrobiomu ponad stukrotnie przewyższa liczbę naszych własnych genów (71). Dodatkowe bakteryjne geny kodujące enzymy, które wchodzą w skład wielu szlaków metabolicznych, pozwala nam m.in. na wykorzystanie nierozkładanych przez ludzkie enzymy związków organicznych jak błonnik, polifenole, polisacharydy i wytwarzanie niezbędnych dla naszego zdrowia substancji, które z kolei wpływają na procesy metaboliczne i immunologiczne zachodzące w naszym organizmie (89, 122)

TECHNIKI BADAWCZE W BADANIACH MIKROBIOTY

Skład ludzkiej mikrobioty jelitowej poznano dokładniej dopiero w ostatnim dwudziestoleciu, głównie dzięki zastosowaniu w badaniach nowoczesnych technik biologii molekularnej. Wcześniej liczba i gatunki drobnoustrojów występujących w naszym jelicie była mocno niedoszacowana ze względu na brak możliwości hodowli większości gatunków mikroorganizmów występujących w przewodzie pokarmowym. Szacuje się, że nawet 80% drobnoustrojów wykrytych w badaniach z zastosowaniem metod genetycznych nie można hodować w sztucznych warunkach (50). W metodach klasycznych, w celu identyfikacji wyhodowanego szczepu stosuje się wiele technik opartych na fenotypowych cechach danego gatunku bakteryjnego. Bada się kształt i skład ściany komórkowej komórki bakteryjnej (barwienie met. Grama), różnice w budowie antygenów powierzchniowych, cechy biochemiczne takie jak np. aktywność enzymatyczna bakterii i ich zdolność do wzrostu w różnym zakresach pH (96). Znane metody hodowli drobnoustrojów zamieszkujących nasze jelita selektywnie promują wzrost tylko ich części umożliwiając wykrywanie konkretnych patogenów, a pomijając obecność pożytecznych mikroorganizmów. Dopiero badania genetyczne umożliwiły wykrycie materiału genetycznego wielu innych gatunków bakterii niezależnie od ich hodowli. W badaniach mikrobioty najczęściej wykorzystywana jest technika sekwencjonowania następnej generacji (NGS Next Generation Sequencing), która umożliwia identyfikację gatunków bakteryjnych na podstawie porównania wysoce konserwatywnej sekwencji genu 16S rDNA kodującym cząsteczkę 16SrRNA drobnoustrojów obecnych w danym materiale (np. w kale) do sekwencji wzorcowych tego genu dostępnych w specjalistycznych bazach danych. W genie 16SrDNA wykazano 9 regionów zmiennych, od V1 do V9 (90). Ze względów technicznych najczęściej wykonuje się analizę regionów V3 i V4 co często jest wystarczające do identyfikacji większości mikroorganizmów. Badania mikrobiomu wymagają analizy bioinformatycznej ogromnej ilości danych (17, 90). Obecnie dostępnych jest wiele narzędzi do przetwarzania otrzymanych danych z sekwencjonowania jak program QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology – qiime.org) i MOTHUR (mothur.org) (33, 90). Analiza ta polega m.in. na tzw. odszumianiu sekwencji (ang. denoising) poprzez usuwanie odczytów niskiej jakości oraz filtrowaniu chimer i innych artefaktów. Przyporządkowanie sekwencji (ang. alignment) do poziomu taksonomicznego (np. do gatunku lub

rodzaju) odbywa się poprzez ich dopasowanie do reprezentatywnych sekwencji w wyniku czego uzyskuje się operacyjne jednostki taksonomiczne (Operational Taxonomic Units – OTU) (33). Dopasowanie to odbywa się przy pomocy referencyjnej bazy danych mikroorganizmów, a najczęściej stosowane bazy to Silva, GreenGenes i NCBI (5). Zazwyczaj za gatunek bakterii uważa się zidentyfikowane OTU, których sekwencje wykazują 97% i więcej podobieństwa. Jednak często przy zastosowaniu tej techniki jednoznaczne przyporządkowanie otrzymanych OTU do danego gatunku nie jest możliwe, wówczas określa się rodzaj lub rodzinę bakteryjną. Technika sekwencjonowania umożliwia m.in. określenie jednego z najważniejszych wskaźników stanu mikrobioty czyli oznaczenie poziomu jej zróżnicowania (poziom bogactwa mikrobioty). Najczęściej zróżnicowanie mikrobioty jest opisywane za pomocą wskaźnika alfa (alfa diveristy) czyli liczbą gatunków/rodzajów bakteryjnych/OTU wykrywanych u danego pacjenta. Do oznaczania wskaźnika zróżnicowania stosowany jest głównie indeks *Shannon*. Badane jest także zróżnicowanie beta, dotyczące różnic w składzie mikrobioty między różnymi próbkami lub między danymi populacjami. Zróżnicowanie to analizuje się za pomocą różnych indeksów jak np. *Bray–Curtis* dissimilarity, *Jaccard* distance, UniFrac. Kolejną techniką opierającą się na technologii NGS jest tzw. sekwencjonowanie metagenomowe typu shotgun. Metoda ta umożliwia nie tylko oznaczenie szczegółowego składu gatunkowego mikroflory w danej próbce ale także umożliwia badanie funkcjonalne poszczególnych genów bakterii. Jednak wysokie koszty analizy metagenomowej w porównaniu do analizy genu cząsteczki 16SrRNA powodują, że metoda ta jest stosunkowo rzadko stosowana. Niestety wyniki badań mikrobiomu oparte na technologii NGS często obarczone są błędami powstałymi podczas różnych etapów wykonywanych badań. Uzyskane wyniki zależne są w dużej mierze od poziomu wyszkolenia personelu w metodach biologii molekularnej, różnej metodyki pobierania (rodzaj wymazówki, stosowanie podłoża transportowego i jego rodzaj) i przechowywania próbek kału (czas przechowywania i temperatura – temp. otoczenia, +4°C, -20°C, -70°C), metody izolacji DNA (kolumienkowa, automatyczna), amplifikacji i protokołu sekwencjonowania NGS (wybór fragmentu genu cząsteczki 16SrRNA) (14, 28, 46, 67). Część laboratoriów nie weryfikuje uzyskanych wyników badań i nie stosuje odpowiednich kontroli w tym kontroli czystości genetycznej stosowanych odczynników. Powoduje to częste różnice i błędy w uzyskanych wynikach oraz brak możliwości porównania otrzymanych wyników badań pomiędzy różnymi laboratoriami. Niewątpliwie w celu wyeliminowania ewentualnych błędów pomocne byłoby ujednolicenie warunków przeprowadzanych badań, wprowadzenie kontroli jakości oraz wykonywanie badań tylko w certyfikowanych jednostkach z wyszkolonym do tego celu personelem.

SKŁAD ZDROWEJ MIKROBIOTY JELITA CZŁOWIEKA

Pośród rożnych części ludzkiego ciała zamieszkiwanych przez drobnoustroje takich jak np. skóra, narządy płciowe, jama ustna, żołądek, jelita, układ oddechowy, największa liczba bakterii oraz największa ich różnorodność występuje w jelicie grubym człowieka. Tak wysoka koncentracja mikroorganizmów jest spowodowana głównie sprzyjającymi warunkami ich rozwoju dzięki dużej powierzchni pofałdowanych jelit, stabilnej temperaturze i wilgotności oraz stałemu dopływowi pokarmu (78). Uważa się, że przewód pokarmowy noworodka zostaje zasiedlony mikroorganizmami podczas porodu, choć pewna

część naukowców dowodzi, że jelita jak i środowisko życia płodu w łonie matki nie są jałowe (10, 104). Mikrobiota u dzieci karmionych mlekiem matki zawiera głównie bakterie należące do rodzajów: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Bacteroides* (44). Mikrobiota dzieci podlega następnie dynamicznym zmianom. Dopiero w wieku 2-3 lat staje się bardziej stabilna i w swoim składzie zaczyna być podobna do mikrobiomu osoby dorosłej. Większość gatunków bakteryjnych (około 90%) występujących w jelitach dorosłych osób należy do dwóch typów - *Firmicutes* (do których zalicza się głównie rodzaje: *Clostridium, Enterococcus, Lactobacillus, Faecalibacterium, Ruminococcus*) i *Bacteroidetes* (głównie *Bacteroides* i *Prevotella*). W mniejszej ilości występują także bakterie należące do typów: *Actinobacteria* (głównie *Bifidobacterium*), *Proteobacteria* (głównie *Escherichia*), *Verrucomicrobia* i *Euryarchaeate* (78). *King* i wsp. w 98 badanych próbkach kału zdrowych osób z USA stwierdzili obecność 8 typów, 18 rodzin, 23 klas, 38 rzędów, 59 rodzajów i 109 gatunków bakterii (123). Najliczniejsze typy stanowiły odpowiednio: *Bacteroidetes* 73,13 +/-22,16%, *Firmicutes* 22,2 +/-18,6%, *Proteobacteria* 2,15+/-10,39%, *Actinobacteria* 1.82+/-3%. Pośród rodzin bakteryjnych najliczniejsze były: *Bacteroidaceae* 65,58 +/-10,48%, *Lachnospiraceae* (11,46 +/-11,06%, *Ruminococcaceae* 8,35+/-10,48% ponadto wykryto także kilka innych rodzin bakteryjnych z częstością występowania powyżej 1% - *Odoribacteraceae, Rikenellaceae, Bifidobacteriaceae, Enterobacteriaceae i Tannerellaceae*. Najliczniejszym rodzajem był *Bacteroides* 65,58+/-21,84%, a najliczniejszym gatunkiem był *Bacteroides dorei* 17,44 +/-8,74%. Duże badania metagonomowe *Radjabzadeh* i wsp. opublikowane w 2020 roku przeprowadzone w populacji holenderskiej u 1427 dorosłych w wieku od 46 do 88 lat oraz 2111 dzieci w wieku od 9 do 12 lat wskazują, w odróżnieniu od badań *King* i wsp., że w populacji tej w obu grupach badanych osób najwięcej gatunków bakteryjnych/OTU należało do typu *Firmicutes* (74). Autorzy stwierdzili różnice w składzie mikrobioty jelitowej w obu grupach osób, u holenderskich dzieci 57% gatunków/OTU bakterii należała do typu *Firmicutes*, 30% do *Bacteroidetes*, 6% *Proteobacteria*, 4% *Actinobacteria*, 2% *Verrucomicrobia* oraz 1% do innych typów. Natomiast u dorosłych osób stwierdzono, że aż 75% gatunków/OTU bakterii należała do typu *Firmicutes*, tylko 13% do *Bacteroidetes*, 5% *Proteobacteria*, 4% *Actinobacteria*, 1% *Verrucomicrobia* oraz 2% do innych typów. Autorzy wykazali także większe zróżnicowanie alfa mikrobioty u osób dorosłych i przewagę rodzaju *Blautia* natomiast w grupie badanych dzieci zaobserwowany wyższy udział rodzaju *Bacteroides*. Niektóre z badań sugerują występowanie u ludzi różnych typów mikrobioty tzw. enterotypów, różniących się dominującym rodzajem bakteryjnym (13, 19). Opisano trzy enterotypy: *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) i *Ruminococcus* (enterotyp 3). Przewaga ilościowa danego gatunku/rodzaju bakterii może wiązać się z przewagą procesów metabolicznych związanych z tymi bakteriami a co za tym idzie wpływać na zdrowie gospodarza z danym enterotypem. Enterotyp *Bacteroides* powiązany jest z dietą bogatą w białka zwierzęce i tłuszcze, natomiast enterotyp *Prevotella* łączony jest z dietą z przewagą węglowodanów. Koncepcja występowania enterotypów u człowieka w środowisku naukowym ma swoich zwolenników oraz przeciwników i wymaga przeprowadzenia wielu dodatkowych badań.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA MIKROBIOTĘ I JEJ ZRÓŻNICOWANIE

Przez tysiące lat organizm człowieka ewoluował wspólnie z zasiedlającymi go mikroorganizmami. Jelita wykazują specjalne przystosowania do obecności w nich drobnoustrojów, dzięki którym nie dochodzi do odpowiedzi układu immunologicznego przeciwko naszej mikrobiocie i wytworzeniu stanu zapalnego. Najważniejszymi czynnikami zapobiegającymi przekroczeniu przez komensalne mikroorganizmy bariery nabłonka jelita są ścisłe połączenie enterocytów i wytwarzany w jelicie śluz bogaty w mucynę (108). Drobnoustroje indukują także tolerancję immunologiczną, przez co nie wywołują odpowiedzi układu odpornościowego. Mikrobiota zdrowego człowieka nie jest stała. W ciągu naszego życia podlega różnorodnym dynamicznym zmianom i modyfikacjom pod wpływem zarówno czynników wewnętrznych, takich jak: rodzaj porodu, płeć, dieta, wiek, jak i zewnętrznych jak np.: klimat środowiska, higiena, warunki socjo-ekonomiczne. Z tego względu nie jesteśmy w stanie opisać wzorcowej mikrobioty osoby zdrowej. Zauważalna jest różnica w składzie mikrobioty już w początkowej fazie życia człowieka. Szczególnie duże różnice obserwowane są u noworodków urodzonych siłami natury i urodzonych cięciem cesarskim. Podczas naturalnego porodu noworodek ma kontakt z mikroorganizmami zasiedlającymi drogi rodne kobiety jak i tymi znajdującymi się w kale. U tych noworodków stwierdza się większy odsetek *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus i Bacteroides*. Natomiast u noworodków urodzonych przez cięcie cesarskie obserwowane jest mniejsze zróżnicowanie mikrobioty, w której dominują mikroorganizmy bytujące głównie w środowisku szpitalnym i na ludzkiej skórze jak np. *Clostridium, Staphylococcus, Corynebacterium* i *Propionibacterium* (78). Wpływ na mikrobiotę w tym okresie życia człowieka ma także sposób karmienia noworodka. U noworodków karmionych mlekiem matki stwierdza się większą ilość *Bifidobacterium* natomiast u noworodków karmionych specjalnymi mieszankami wykrywa się więcej bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae*, *Bacteroide* i *Clostridium*. Uważa się, że mikrobiota dziecka w wieku około 3 lat przypomina już składem mikrobiotę osób dorosłych. Wzrasta stopniowo udział *Bacteroides* i innych rodzajów bakteryjnych przy obniżeniu udziału *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. U dorosłego człowieka skład mikroflory ulega pewnej stabilizacji, choć wpływa na nią każda, nawet krótkotrwała zmiana diety lub stosowane leczenie (101). U osób starszych powyżej 65 roku życia zmniejsza się liczba gatunków bakteryjnych i zaczynają przeważać te o prozapalnych właściwościach (np. *Enterobacteriaceae, Clostridium*) (78). Jest to związane z obniżeniem odporności i sprawności u ludzi z tej grupy wiekowej oraz częstszej hospitalizacji i zwiększonej ilości przyjmowanych leków. Uważa się, że szczególnie negatywny wpływ na skład mikrobioty jelitowej człowieka wykazują antybiotyki. Substancje te stosuje się do walki z zakażeniami wywołanymi przez patogenne bakterie, jednak ich użycie, zwłaszcza doustne, powoduje zniszczenie naturalnej mikrobioty. Niebezpieczne pod tym względem są antybiotyki i chemioterapeutyki o szerokim spektrum działania, które wykazują również aktywność wobec korzystnych dla naszego zdrowia gatunków bakteryjnych (21, 55, 78). Często w miejsce pożytecznych drobnoustrojów pojawiają się patogenne lub względnie patogenne bakterie i grzyby mogące powodować stany chorobowe jelit.

Szczególnie ważnym czynnikiem wpływającym na skład mikrobioty człowieka jest rodzaj spożywanego pokarmu. Na świecie występuje wiele różnorodnych diet, które

ukształtowały się na podstawie dostępu do żywności na danym obszarze, uwarunkowań religijnych i kulturowych. Uważa się, że szczególnie zdrowa jest dieta bogata w duże ilości spożywanych warzyw, owoców, nasion roślin, tłuszczów nienasyconych oraz uboga w tłuste, czerwone mięso, cukry proste i sól. U osób spożywających duże ilości produktów roślinnych w składzie mikrobioty obserwuje się większy udział bakterii z rodzaju *Prevotella* (52, 78), natomiast u osób spożywających duże ilości tłuszczy i białek zwierzęcych przeważają bakterie z rodzaju *Bacteroides*. Badania przeprowadzone przez *Moraes* i wsp. na grupach osób wszystkożernych, wegetarian ścisłych i wegetarian spożywających produkty mleczne oraz jaja wskazują na większy udział enterotypu *Prevotella* u wegetarian w porównaniu do innych analizowanych grup (19). Udział procentowy enterotypu *Prevotella*, *Bacteroides* i *Ruminococcus* u wegetarian wynosiła odpowiednio 40%, 20,7% i 20,6%, podczas gdy u innych grup częstości te były do siebie porównywalne. Autorzy powiązali enterotyp *Prevotella* z korzystnym profilem kardiometabolicznym. Oznaczenie frakcji cholesterolu LDL wskazało na jego niższy poziom u osób posiadających enterotyp *Prevotella*, bez względu na dietę tych osób w porównaniu do poziomu LDL u osób posiadających inne enterotypy. Postępująca globalizacja i urbanizacja wpływają na przejmowanie w krajach rozwijających się Azji, Afryki i Ameryki Płd zachodniego sposobu odżywiania z ułatwionym dostępem do wysoce kalorycznego pokarmu, co określa się mianem „westernizacji diety". Naukowcy uważają, że przejmowanie nieodpowiednich zachodnich wzorców dietetycznych, jak spożywanie wysoce przetworzonych produktów spożywczych bogatych w wysokoenergetyczne nasycone tłuszcze, produktów typu fast-food i cukrów prostych, ma wpływ na pogorszenie się stanu zdrowia i rozwój tzw. chorób cywilizacyjnych. Westernizacja diety ma także wpływ na skład i zróżnicowanie mikrobioty człowieka. Badania przeprowadzone przez *Shin* i wsp. dowodzą wpływu „westernizacji diety" na kształt mikrobioty w społeczności mieszkańców Korei Południowej odżywiających się w sposób typowy dla tradycyjnej kuchni koreańskiej (dieta bogata w warzywa, nasiona i produkty fermentowane z niskim spożyciem mięsa i tłuszczy odzwierzęcych) oraz w sposób typowy dla zachodniej diety (88). Autorzy zaobserwowali u Koreńczyków odżywiających się w sposób tradycyjny występowanie wysokiego odsetka gromady *Firmicutes* w stosunku do *Bacteroidetes*. Zmniejszenie ilości gromady *Bacteroidetes* w tym rodzaju *Bacteroides* może być związane z niskim spożyciem pokarmów zwierzęcych przez Koreańczyków. Stwierdzono także znaczące zwiększenie w tej grupie obecności w kale korzystnej dla zdrowia probiotycznej bakterii z rodzaju *Weissella*, co może być związane z konsumpcją fermentowanych warzyw takich jak kimchi. U osób spożywających typowa dietę koreańską wykryto także w kale duże ilości bakterii *Coprococcus* powiązanej z produkcją korzystnych dla zdrowia SCFA. Może mieć to wpływ na rzadsze występowanie chorób układu krążenia u Koreańczyków odżywiających się w sposób tradycyjny. Natomiast u Koreańczyków odżywiających się zgodnie z zachodnią dietą stwierdzono obniżenie ilości *Lachnospira*. Niski poziom obecności tej bakterii jest wg tych naukowców powiązany ze zwiększonym poziomem cholesterolu LDL we krwi i otyłością. *Vangay* i wsp zbadali wpływ na mikrobiotę migracji osób zamieszkujących dotychczas Tajlandię, kraj rolniczy, słabo uprzemysłowiony, do wysoce rozwiniętego kraju jakim jest USA (102). W populacji imigrantów zauważalny jest wzrost liczby osób z nadwagą i chorobami powszechnymi w krajach rozwiniętych w porównaniu do populacji zamieszkującej kraj pochodzenia. Autorzy dowodzą, że poza zmianą diety

i stylu życia związanych z „westernizacją" sposobu życia u imigrantów za rozwój chorób cywilizacyjnych może być odpowiedzialna także zmiana mikrobioty. Społeczności imigrantów z Tajlandii (populacje Hmong i Karen), początkowo charakteryzowały się obecnością innej kompozycji mikrobioty w kale, która dodatkowo jest bardziej zróżnicowana w porównaniu do mikrobioty kału u osób urodzonych w USA. Autorzy zaobserwowali stopniowe zmniejszenie udziału bakterii *Prevotella* w badanej mikrobiocie wraz z utratą niektórych gatunków bakteryjnych i zastępowanie jej przez *Bacteroides* w kale społeczności pochodzącej w kolejności z Tajlandii, imigrantów z Tajlandii w pierwszym i drugim pokoleniu oraz Amerykanów urodzonych w USA. Analiza metagenomowa wykazała także spadek ilości bakteryjnych genów związanych z produkcją enzymów rozkładających roślinny błonnik. Nawet krótki pobyt migrantów w USA powodował obserwowany spadek w kale ilości bakterii z rodzaju *Prevotella* na rzecz *Bacteroides*. Autorzy podkreślają, że na uzyskane wyniki zmiany składu mikrobioty u migrantów może mieć wpływ poza zmianą diety także wiele niebadanych dodatkowych czynników jak np. stres, jakość wody pitnej, leczenie przeciw pasożytom itd. Jednakże utrata niektórych gatunków bakteryjnych ze składu mikrobioty, tzw. „znikająca mikrobiota", szczególnie gatunków z rodzaju *Prevotella* zdolnych do rozkładu różnego rodzaju węglowodanów, a co za tym idzie utrata funkcjonalnej różnorodności mikrobioty może mieć wpływ na zdrowie gospodarza i może tłumaczyć wg autorów zjawisko występowania przewlekłych chorób cywilizacyjnych u mieszkańców krajów wysoce rozwiniętych. Wysoko przetworzone produkty spożywcze, charakterystyczne dla diety zachodniej, poza dużą ilością tłuszczy i soli często zawierają także dodatki takie jak np. związki stabilizujące, zagęszczające i konserwujące, emulgatory, różnego rodzaju słodziki i wzmacniacze smaku. Mają one na celu wydłużenie czasu przydatności produktów do spożycia oraz poprawę ich smaku, konsystencji i koloru. Substancje te nie powinny wpływać na nasze zdrowie jednak liczne badania naukowe potwierdzają szkodliwy efekt stosowania przynajmniej niektórych z tych substancji. Badania przeprowadzone przez *Copy Chassaing* i wsp. (16) na modelu mysim potwierdzają wpływ emulgatorów takich jak polisorbat80 i karboksymetyloceluloza na spadek zróżnicowania mikrobioty oraz przepuszczalność błony śluzowej jelita prowadząc m. in. do powstania stanów zapalnych jelita i zespołu metabolicznego w tym otyłości. Niektórzy naukowcy wskazują także na wpływ słodzików (low/no-calorie sweeteners - LNCS) na skład mikrobioty. Spożywanie tych substancji może prowadzić do rozwinięcia się nietolerancji glukozy i zespołu metabolicznego (95), choć zdania na temat wpływu słodzików na mikroflorę jelitową są podzielone (Zmora N i wsp. 2019). W ostatnich latach bada się także wpływ na nasze zdrowie spożywanego mięsa i innych produktów zawierających duże ilości białka zwierzęcego. Czerwone mięso bogate jest w związki L-karnityny i choliny. Mikroflora jelitowa odgrywa także rolę w procesie metabolizmu tych związków. Substancje te są przekształcane przez mikroflorę jelitową do trimetyloaminy (trimethylamine - TMA), a następnie w wątrobie ulegają przekształceniu do tlenku trimetyloaminy (trimethylamine-N-oxide - TMAO). Zaobserwowano, że podwyższone stężenie TMAO stanowi czynnik ryzyka chorób układu krążenia (zawał serca, udar), miażdżycy tętnic i niealkoholowego stłuszczenia wątroby (12, 22, 121).

Kolejnym czynnikiem wpływającym na skład i zróżnicowanie mikrobioty jest środowisko życia człowieka. Stale zmieniające się warunki związane z globalizacją i migracją ludności z terenów wiejskich do wielkich miast pociąga za sobą wiele zmian w życiu

człowieka, w jego diecie i stylu życia. Uważa się, że ludzie żyjący w obecnie nielicznych, pierwotnych populacjach (tzw. społeczeństwa zbieracko-łowieckie) wykazują większe zróżnicowanie mikrobioty (większy wskaźnik zróżnicowania alfa) niż społeczeństwa rolnicze i przemysłowe w krajach rozwiniętych. W jelitach osób z populacji pierwotnych występują także unikalne rodzaje bakterii nie występujące w populacjach rozwiniętych. *Schnorr* i wsp wykazali duże zróżnicowanie mikrobioty jelitowej w kale osób pochodzących z plemienia Hadza tworzącego pierwotną, niewielką populację zbieracko-łowiecką zamieszkującą region Wielkiego Rowu Afrykańskiego w Tanzanii w porównaniu do składu mikrobioty w kale osób pochodzących z Bolonii we Włoszech (84). Autorzy stwierdzili większy udział bakterii *Prevotella*, *Treponema*, *Ruminococcaceae*, niektórych gatunków *Bacteroides* i *Clostridium* w kale osób z populacji Hadza. Bakterie te mogą wspomagać trawienie składników roślinnych wchodzących w skład pożywienia tego plemienia. *Smits* i wsp badający mikrobiotę w kale osób pochodzących z tego samego plemienia stwierdzili ponadto dużą sezonowość składu mikrobioty na którą ma wpływ pora sucha i wilgotna (89). Autorzy zaobserwowali większe zróżnicowanie mikrobioty w porze suchej, co jest powiązane z rodzajem spożywanego wówczas pokarmu. Ponadto naukowcy zaobserwowali także zróżnicowanie mikrobioty u członków plemienia Hadza w zależności od płci. Kobiety należące do tej społeczności, które spożywały głównie rośliny, owoce i bulwy zbierane wokół osady, wykazywały większy odsetek krętek *Treponema*. Natomiast u mężczyzn, u których dieta zawierała większy udział mięsa pozyskanego w wyniku łowów z dala od osady, stwierdzono obecność w kale większego odsetka bakterii z rodzaju *Blautia* i *Eubacteria*. Nie odnotowano tego rodzaju różnic w składzie mikrobioty w kale u osób pochodzących z Włoch, prawdopodobnie ze względu na podobną dietę u obu płci. Wyniki badań uzyskane metodą sekwencjonowania metagenomowego próbek kału pochodzących od osób z plemienia Hadza w porównaniu do grupy kontrolnej z USA wykazały większy udział kodowanych przez geny mikrobioty enzymów rozkładających węglowodany (carbohydrate active enzyme - CAZymes) w populacji Hadza. Wskazuje to na większe przystosowanie mikrobioty tego plemienia do trawienia składników roślinnych wchodzących w skład ich diety. Naukowcy porównali także skład mikrobioty plemienia Hadza ze składem mikrobioty pochodzącej z próbek uzyskanych od osób z kilkunastu różnych społeczności świata, zarówno tradycyjnych i rozwiniętych. Stwierdzono, że populacje z krajów rozwiniętych charakteryzują się występowaniem w kale większej ilości bakterii *Bacteroidaceae* (średnio 20,9% vs 0,8 w populacjach tradycyjnych) natomiast populacje pierwotne (tradycyjne) wykazywały większy udział bakterii *Prevotellaceae* (średnio 29,8 vs 7,6 w społecznościach rozwiniętych). Stwierdzono także obecność *Spirochaetaceae* i *Succinivibrionaceae* w tradycyjnych społecznościach, podczas gdy w społecznościach rozwiniętych rodzaje te są rzadkie lub nie występują w ogóle. Natomiast *Verrucomicrobia* występowały w znacznej ilości jedynie w społecznościach rozwiniętych. Badanie przeprowadzone u dzieci europejskich odżywiających się zgodnie z tzw. dietą zachodnią oraz u dzieci z Burkina Faso (państwo w Afryce Zachodniej) stosujących dietę zawierającą bardzo mało lipidów i białek zwierzęcych, natomiast bogatą w produkty roślinne takie jak proso, sorgo i lokalne warzywa) ujawniło, że afrykańska mikroflora dziecięca jest niezwykle bogata w rodzaje *Prevotella* i *Xylanibacter*, które są zdolne do rozkładu celulozy i ksylanów (18). Rodzaje te nie były wykrywane u dzieci europejskich, u których wykazano także niższy poziom obecności SCFA i wyższy odsetek

rodzaju *Escherichia* w porównaniu do dzieci z Burkina Faso. Wg autorów dieta dzieci afrykańskich może przyczynić się do ochrony przed niezakaźnymi chorobami zapalnymi jelit. *Jha* i wsp. badali różnice w składzie mikrobioty w kale u czterech różnych wiejskich himalajskich populacji zamieszkujących Nepal (43). Populacje te zamieszkiwały podobny obszar geograficzny Himalajów, różniły się jednak poziomem transformacji społeczeństwa z formy zbieracko łowieckiej (populacja Chepang) do nowoczesnej rolniczej gospodarki (populacje Raji, Raute i Tharu). Choć nie stwierdzono znaczących zmian w ogólnej liczbie gatunków bakteryjnych (zróżnicowanie alfa) między populacjami, to wykazano duże różnice w składzie mikrobioty w poszczególnych populacjach przez obecność lub brak danych taksonów bakteryjnych w danej grupie. Autorzy dokonali także porównania mikrobioty himalajskich populacji do grupy kontrolnej pochodzącej z USA. Wszystkie cztery populacje zamieszkujące Himalaje wykazywały mniejsze różnice w składzie mikrobioty między sobą niż w porównaniu do mikrobioty grupy osób z USA. Stwierdzono większy udział bakterii z gromady *Proteobacteria* w badanych populacjach, szczególnie w populacji pierwotnej Chepang w porównaniu do grupy próbek pochodzących od osób zamieszkujących USA. Z kolei w kale osób z grupy kontrolnej z USA dominowały gromady *Actinobacteria, Firmicutes i Verrucomicrobia*, które wykrywano w mniejszej ilości w kale u osób pochodzących z nowoczesnej, rolniczych populacjach himalajskich (Raji, Raute i Tharu) i najmniejszej w populacji pierwotnej Chepang. Autorzy wykazali, że większy udział przedstawicieli gromady *Proteobacteria* i niższy udział bakterii z gromady *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* w kale dotyczy także innych pierwotnych populacji zamieszkujących różne rejony świata. Ponadto wykazano, że populacje himalajskie, które relatywnie niedawno przekształciły się ze społeczeństw pierwotnych w społeczeństwa rolnicze charakteryzowały się m.in. obecnością w kale bakterii z rodzaju *Ruminobacter* i *Treponema*, które są powiązane z metabolizmem składników pokarmów roślinnych. Stwierdzono także większy udział bakterii *Prevotella* i *Eubacterium* powiązanych z dietą wegetariańską w kale osób z populacji himalajskich. Osoby te tradycyjnie, jak w całym regionie, spożywają głównie produkty roślinne w porównaniu do grupy osób z USA. Natomiast rodzaje *Bacteroides* i *Blautia*, które są powiązane z dietą bogatą w białka i tłuszcze zwierzęce w większej ilości występowały w kale osób z grupy kontrolnej z USA. Badacze stwierdzili ponadto duży wpływ źródła wody pitnej na skład mikrobioty. Populacje korzystające z wody pitnej pobieranej z rzeki wykazywała w próbkach kału obecność większego odsetka krętek *Treponema* w porównaniu do populacji korzystających z wody głębinowej, które z kolei wykazywały większy udział w składzie mikrobioty bakterii z rodzaju *Fusobacterium*.

Niektórzy naukowcy postulują, że wśród czynników wpływających na zróżnicowanie mikroflory poza czynnikami zewnętrznymi, ważny jest także genotyp człowieka. Jednym z genów wymienianych jako modyfikator mikrobioty jest *FUT2* kodujący fukozylotransferazę 2, która bierze udział w tworzeniu antygenu H w płynach ustrojowych i błonie śluzowej jelit (99, 103). W zależności od obecności polimorfizmu G428A (W143X) - rs601338, wyróżnia się u ludzi typ sekrecyjny i niesekrecyjny *FUT2*. Typ sekrecyjny charakteryzuje się obecnością formy heterozygotycznej lub homozygotycznej nukleotydu G – guaniny w miejscu rs601338 (genotypy SeSe (GG) lub Sese (GA)). Typ niesekrecyjny natomiast charakteryzuje się obecnością adeniny w miejscu rs601338 w postaci homozygotycznej (genotyp sese (AA)) i może mieć związek z niektórymi chorobami jak np. cho-

roba Leśniowskiego-Crohna, cukrzycą typu 1, kandydozą pochwy, zapaleniami układu moczowo-płciowego (99, 103). Zaobserwowano także różnice między składem populacji mikroflory między poszczególnymi genotypami m.in. z większą ilością bakterii z rodzaju *Blautia, Dorea formicigenerans, Ruminococcus gnavus*, *Clostridium sphenoides* i mniejszym zróżnicowaniem mikrobioty u ludzi z genotypem niesekrecyjnym. Bakterie te oraz niskie zróżnicowanie mikrobioty są powiązane z występowaniem nieswoistych zapalnych chorób jelit oraz zespołu jelita nadwrażliwego (103). Szczególnie pomocne w poznaniu zależności między danym genotypem i składem mikrobioty człowieka są badania typu GWAS (Genome-Wide Association Studies), w których analizuje się związek polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w ludzkim genomie z wybraną cechą np. konkretnym składem mikrobioty. W ten sposób stwierdzono związek między występowaniem u osób z genotypem CC (C13910C, rs4988235) w regionie promotorowym genu *LCT* (w obrębie intronu genu *MCM6*) w chromosomie 2 zwiększonej ilości bakterii z rodzaju *Bifidobacteria* w porównaniu z osobami genotypem CT i TT (32). Gen *LCT* koduje enzym laktazę rozkładający cukier mleczny laktozę do glukozy i galaktozy. Obecność genotypu CC wpływa na ekspresję genu *LCT* i związana jest z nietolerancją laktozy u dorosłych, co przy spożyciu produktów mlecznych powoduje przedostanie się niestrawionej laktozy do jelita grubego, gdzie cukier ten jest wykorzystywany m.in. przez *Bifidobacteria* jako źródło energii. Postuluje się, że obecność *Bifidobacteria* nadaje pewien stopień tolerancji laktozy u osób z nietolerancją na ten cukier (32). W badaniach *Hughes* i wsp. z 2020 roku potwierdzono wpływ polimorfizmu CC (rs4988235) w regionie promotorowym genu *LCT* na obfitość występowania bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, a ponadto zidentyfikowano kilka nowych loci związanych z modyfikacją mikrobioty (41). Najsilniejszy związek wykazano między występowaniem bakterii z rodzaju *Ruminococcus* i rs150018970 blisko genu RAPGEF1 w chromosomie 9 i pomiędzy bakteriami z rodzaju *Coprococcus* i rs561177583 w genie LINC01787 w chromosomie 1. Potrzebne są dalsze badania, które pozwolą w pełni zrozumieć zakres wpływu genotypu gospodarza na skład i funkcję mikrobiomu jelitowego oraz ewentualne związki między genotypem a możliwością wystąpienia wybranych chorób.

PROZDROWOTNE FUNKCJE MIKROBIOTY JELITOWEJ

Mikrobiota jelitowa pełni w naszym organizmie wiele ważnych funkcji. Zapobiega kolonizacji jelit przez bakterie chorobotwórcze; hamując ich wzrost (bakterie komensalne modyfikują pH jelit, wytwarzają toksyczne bakteriocyny i antybakteryjne peptydy), zajmując przestrzeń życiową (niszę), zużywając dostępne składniki odżywcze, wpływając na różnorodne szlaki sygnalizacji komórkowej organizmu oraz biorąc udział w dojrzewaniu i regulacji komórek odpornościowych (9, 17, 47, 76, 78). Mikrobiota i wytwarzane przez nią metabolity wpływają na integralność nabłonka jelitowego regulując ścisłe połączenia międzykomórkowe nabłonka (ang. tight junctions) (26). Mikroflora jelitowa bierze także udział w produkcji i metabolizmie mucyny wchodzącej w skład śluzu jelitowego (20). Poprzez utrzymanie integralności nabłonka jelit zapobiega inwazji chorobotwórczych bakterii oraz zapobiega przedostawaniu się szkodliwych składników bakteryjnych jak toksyny czy składniki błony komórkowej do krwioobiegu i innych narządów co mogłoby przyczynić się do rozwoju w nich stanów zapalnych (27). Istotne znaczenie mikro-

biomu dla zdrowia człowieka sprawiło, że część naukowców uważa zbiorowisko mikroorganizmów za nowy ludzki „narząd" (63). Mikroorganizmy zamieszkujące ludzkie jelita tworzą między sobą skomplikowaną sieć zależności, w których produkty metabolizmu jednego gatunku mogą stanowić pokarm dla innych. Jedną z najważniejszych funkcji bakterii jelitowych jest zdolność do wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA – short chain fatty acid) jak np. octany, propioniany i maślany (81). Substancje te, szczególnie maślany, stanowią źródło energii dla enterocytów - komórek nabłonka jelita. Maślany wzmagają proliferację i dojrzewanie enterocytów, przez co wpływają na ewentualną przepuszczalność bariery śluzówkowej jelita. Maślany posiadają też funkcję antynowotworową przez ich zdolność do indukowania apoptozy nowotworowych komórek jelita oraz regulacji ekspresji genów przez inhibicję (inhibiting histone deacetylases). Propioniany także odżywiają enterocyty, ponadto są transportowane do wątroby gdzie wchodzą w skład szlaku metabolicznego glukoneogenezy oraz oddziałują na receptory związane z sytością. Octany z kolei stanowią źródło pokarmu dla wielu bakterii oraz biorą udział w metabolizmie cholesterolu i tłuszczy. Bakteriami produkującymi maślany są głównie rodzaje należące do *Firmicutes* jak np. niektóre rodzaje z rodziny *Lachnospiraceae* i gatunek *Faecalibacterium prausnitzii*, z kolei propioniany są produkowane przede wszystkim przez gatunki należące do *Bacteroides* oraz niektóre gatunki *Clostridium*, natomiast octany produkuje wiele różnorodnych mikroorganizmów. Mikrobiota jelita bierze także udział w syntezie witamin z grupy B (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 i B12), K, biotyny i kwasu foliowego oraz w absorpcji jonów wapnia, żelaza i magnezu. Szczególnie gatunki należące do *Bacteroides* posiadają potencjał do wytwarzania witamin z grupy B, choć witamina B12 jest wytwarzana głównie przez bakterie należące do *Fusobacteria* (81, 117). Mikrobiota odgrywa rolę w modulowaniu prawidłowego działania osi mózgowo-jelitowej (27, 29). Niektóre gatunki bakterii biorą udział w gospodarce kwasów żółciowych, tłuszczy, karnityny i fosfatydylocholiny. Mikroflora stymuluje zarówno swoiste jak i nieswoiste mechanizmy odporności, działa na tkankę limfatyczną związaną jelitem (GALT), pobudza syntezę przeciwciał, wpływa na ekspresję receptorów Toll-like (64, 65, 122). Wśród naukowców zajmujących się tematyką mikrobioty ludzkiej przeważa pogląd mówiący, że im większe jest zróżnicowanie mikrobioty tym jesteśmy zdrowsi.

MIKROBIOTA JELITOWA W CHOROBIE

Gwałtowne zmiany w składzie i/lub liczebności (zaburzenie homeostazy) mikroflory jelitowej prowadzą do tzw. „dysbiozy" (107). Za jej powstanie odpowiada wiele różnorodnych czynników jak np. zmiana diety, stres, styl życia, stosowanie antybiotyków lub używek. Ze względu na problemy z odpowiednim doborem grup kontrolnych pacjentów w badaniach mikrobioty wynikające ze znacznego zróżnicowania diety i środowiska życia człowieka, w badaniach tych stosuje się głównie modele zwierzęce. Modele te, choć nie są w stanie w pełni odwzorować organizmu człowieka (62), przyczyniły się do poznania wpływu mikrobioty na ludzkie zdrowie. Badania prowadzone są często na zwierzętach gnobiotycznych (germ free), które są wolne od wszystkich wykrywalnych mikroorganizmów. Zaobserwowano, że jelita takich zwierząt mają mniejszą powierzchnię, wykazują nieprawidłową perystaltykę i upośledzone wchłanianie składników pokarmowych (17, 78). Dysbiozę mikrobiomu u człowieka wiąże się z występowaniem różnorodnych

problemów zdrowotnych jak np. zapalnymi chorobami jelitowymi (inflammatory bowel disease - IBD) w tym chorobą Leśniowskiego-Crohna, zespołem jelita drażliwego (IBS) i schorzeniami metabolicznymi (14, 17, 59, 78, 109). Niektórzy naukowcy wiążą dysbiozę z objawami zespołu chronicznego zmęczenia, depresji, autyzmu i zaburzeń endokrynologicznych oraz z rozwojem nowotworów przewodu pokarmowego, niealkoholowego stłuszczenia wątroby, a nawet alergii (1, 49, 83, 98). Zaobserwowano, że schorzenia te są powiązane z występowaniem różnorodnych objawów gastrycznych jak biegunka, zaparcia, ból brzucha i wzdęcia. Dieta bogata w cukry proste, tłuszcze nasycone i emulgatory a uboga w roślinny błonnik może sprzyjać rozwojowi nieodpowiedniej flory bakteryjnej i przyczynić się do wystąpienia chorób zapalnych. W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na rolę mikroflory jelitowej w patogenezie chorób cywilizacyjnych takich jak otyłość, cukrzyca typu 2 i miażdżyca (12, 36, 48). Mikroflora wpływa także na zwiększoną przepuszczalność jelita, co może prowadzić do przedostania się fragmentów bakterii i ich toksyn (jak np. endotoksyny, lipopeptydy) do układu krwionośnego prowadząc do uogólnionej endotoksemii objawiającej się m.in. przewlekłym stanem zapalnym, co także uważa się za możliwy czynnik sprawczy otyłości, chorób neurodegeneracyjnych i nowotworów jelita grubego (11, 27, 42, 57). W dalszej części publikacji przedstawiono szczegółowe informacje na temat wybranych chorób powiązanych z zaburzeniami ilościowymi i jakościowymi mikrobioty.

NIESWOISTE ZAPALNE CHOROBY JELIT ORAZ ZESPÓŁ JELITA NADWRAŻLIWEGO

Nieswoiste zapalne choroby jelit (Inflammatory Bowel Diseases - IBD) jest to grupa przewlekłych enteropatii o złożonej patogenezie, charakteryzujących się długotrwałymi lub nawracającymi objawami (z okresami remisji i nawrotów) ze strony przewodu pokarmowego o niewyjaśnionej przyczynie, powiązana ze zmianami histopatologicznymi oraz z przewlekłym stanem zapalnym na terenie błony śluzowej jelit cienkiego oraz grubego (15, 111, 112). Do nieswoistych zapalnych chorób jelit zalicza się m.in. chorobę Leśniowskiego-Crohna (Crohn's Disease – CD) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (Colitis Ulcerosa – CU). Szczyt zachorowań na nieswoiste zapalne choroby jelit przypada między 16 a 25 rokiem życia. Drugą grupą co do częstości zachorowań są dzieci przed 16 rokiem życia, a następnie dorośli z początkiem wystąpienia objawów w starszym wieku - między 55 i 65 rokiem życia (15). Najczęściej występujące objawy IBD to przewlekła biegunka, gorączka, bóle brzucha, wzdęcia, niedowaga i ogólne osłabienie. Etiologia nieswoistych zapaleń jelit do tej pory nie jest w pełni poznana. Uważa się, że czynniki: mikrobiologiczne (zaburzenia mikrobioty jelitowej), środowiskowe, predyspozycje genetyczne, autoimmunologiczne mają największy wpływ na rozwój choroby. Za jedną z przyczyn powstawania nieswoistych zapalnych chorób, uważa się poprawę stanu sanitarno-higienicznego środowiska życia człowieka ze zmniejszoną ekspozycją na infekcję oraz stosowanie antybiotyków w dzieciństwie, co może mieć wpływ na późniejszy rozwój choroby (59, 92). Uważa się, że na rozwój zespołu Leśniowskiego-Crohna mają wpływ m.in. mutacje w ludzkim genie *NOD2* oraz obecność w jelitach zwiększonej ilości bakterii *Fusobacterium* i należących do gromady *Proteobacteria* (rodzina *Enterobacteriaceae*) enteroadhezyjnych pałeczek *E. coli* oraz pałeczek *Klebsiella.* Zaobser-

wowano także zmniejszenie ilości potencjalnie ochronnych dla jelit bakterii należących do gromady *Firmicutes,* w tym *Faecalibacterium prausnitzii, Ruminococcus sp.* i *Clostridium* klastery IV i XIVa (15, 66). Postulowany jest także wpływ stresu oksydacyjnego wywołanego przewlekłym stanem zapalnym na zachwianie równowagi mikrobioty poprzez zmniejszenie liczby prawidłowej beztlenowej mikroflory na rzecz fakultatywnie beztlenowych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* w tym patogennych szczepów *Escherichia coli* (109). U osób z zespołem Leśniowskiego-Crohna zaobserwowano również znaczne (powyżej 25%) zmniejszenie różnorodności mikroflory jelita grubego w stosunku do zdrowych osób, co z kolei może powodować zmniejszenie ilości produkowanych przez pożyteczne mikroorganizmy witamin i prozdrowotnych związków, takich jak np. SCFA (15, 66). Ponieważ nie każdy przypadek dysbiozy prowadzi do powstania niespecyficznych zapaleń jelita, postulowany jest duży wpływ indywidualnych predyspozycji chorych osób na rozwój tego typu schorzeń. Obecnie nie jest znana skuteczna metoda leczenia eliminująca całkowicie objawy choroby. Stosuje się leki przeciwzapalne, immunosupresyjne oraz leczenie biologiczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych, postuluje się także możliwość prozdrowotnej modulacji mikrobioty jelitowej (15, 66). Stwierdzono, że zmiana diety chorego na tzw. dietę eliminacyjną Low FODMAP (Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides And Polyols), wpływa na złagodzenie objawów chorobowych jak wzdęcia, ból brzucha i biegunki (111). Jest to dieta o niskiej zawartości fermentujących węglowodanów jak np. fruktoza, laktoza, czy też alkohole cukrowe (np. glikol, sorbitol, ksylitol, mannitol), FOS (fruktooligosacharydy) i GOS (galaktooligosacharydy), które są źródłem pokarmu dla bakterii jelitowych. Bakterie rozkładając te związki wytwarzają jako produkt uboczny gazy (wodór, metan, siarczki) wywołujących wzdęcia, ból i dyskomfort. Niestety konsekwencją stosowania diety Low FODMAP są zaburzenia składu mikrobioty jelitowej a co za tym idzie niedobory niektórych składników odżywczych (związków mineralnych i witamin) a przede wszystkim upośledzenie wytwarzania korzystnych dla organizmu SCFA odżywiających enterocyty oraz osłabienie perystaltyki jelita i trudności z wypróżnianiem. Stosowanie niektórych probiotyków także łagodzi objawy nieswoistych chorób zapalnych jelita (111). Wymaga to jednak dalszych badań pod względem doboru odpowiedniego składu jakościowego i ilościowego stosowanych probiotyków. Kolejną dysfunkcją jelit w której doszukuje się związku pomiędzy jej rozwojem a zaburzeniami składu mikrobioty jest zespół jelita nadwrażliwego (Irritable Bowel Syndrome – IBS). W odróżnieniu od nieswoistych zapaleń jelita do których należą groźne dla życia choroby takie jak opisane powyżej zespół Leśniowskiego – Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelita, IBS stanowi zespół objawów chorobowych jak np. ból brzucha, zmiana ilości wypróżnień, biegunki, zaparcia, bez uchwytnych diagnostycznie zmian zapalnych jelita. Szacuje się, że IBS może dotyczyć nawet ok. 20% dorosłych osób (61). Przyczyny zespołu nie są do końca poznane, choć za jedną z powodów jego powstania wymienia się stres i inne czynniki psychologiczne, stąd zainteresowanie naukowców tzw. osią jelito-mózg i dwukierunkowym wpływem mikrobioty jelita na układ nerwowy. Zaobserwowano, że w przypadku zespołu jelita drażliwego na wystąpienie objawów wpływa nadmierny rozrost flory bakteryjnej w jelicie cienkim (Small Intestinal Bacterial Overgrowth - SIBO) (97). SIBO można potwierdzić m.in. przez posiew aspiratu z jelita cienkiego i wykrycie >10^3 jednostek tworzących kolonię [CFU] na 1 ml aspiratu. Ponadto SIBO charakteryzuje się obecnością w mikrobiocie jelita

cienkiego gatunków bakterii normalnie występujących w jelicie grubym jak np. *E.coli, Klebsiella* sp., *Enterococcus* oraz dodatnim wynikiem wodorowego testu oddechowego z glukozą. U osób wykazujących objawy IBS z dominującymi zaparciami wykrywany jest także drobnoustrój należący do archeonów - *Methanobrevibacter smithii*. Archeon ten odpowiedzialny jest za wytwarzanie metanu, który może być wykryty w wodorowo--metanowym teście oddechowym. Podobnie jak w przypadku zespołu Leśniowskiego--Crohna trwają obecnie prace nad modulacją mikrobioty jelita osób chorych np. przez stosowanie probiotyków i odpowiedniej diety, w celu zmniejszenia uciążliwości objawów IBS (61). Zarówno nieswoiste zapalne choroby jelit jak i zespół jelita nadwrażliwego stanowią uciążliwy problem dla dotkniętych tymi chorobami ludzi na całym świecie. Dalsze badania nad przyczynami powstawania chorób zapalnych jelita mogą pozwolić na zaprojektowanie właściwego ich leczenia i zapobiegania.

RZEKOMOBŁONISTE ZAPALENIE JELITA GRUBEGO

Rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego jest związane z zakażeniem bezwzględnie beztlenową Gram-dodatnią laseczką toksynotwórczego szczepu *Clostridioides difficile* (dawna nazwa *Clostridium difficile*). Choroba występuje głównie u pacjentów, u których zakażenie nastąpiło w środowisku szpitalnym lub w domach opieki po antybiotykoterapii, szczególnie po stosowaniu cefalosporyn II i III generacji oraz fluorochinolonów. Antybiotyki te wyniszczają naturalną mikrobiotę jelitową, co skutkuje zwolnieniem niszy dla patogennych *Clostridioides* (45, 54). Najbardziej narażone na zakażenie są osoby powyżej 65 roku życia, długotrwale leczone antybiotykami, stosujące leczenie inhibitorami pompy protonowej, pacjenci długotrwale przebywający w szpitalu, szczególnie na oddziałach onkologicznych. Toksynotwórcze laseczki *C. difficile* wydzielają toksynę A (enterotoksynę) i toksynę B (cytotoksynę), które odpowiedzialne są za powstanie objawów chorobowych u zakażonej osoby. Szczególnie niebezpieczny dla zdrowia jest hiperwirulentny szczep *C. difficile* NAP1/BI/027 (54). Część szczepów *C. difficile* w tym hiperwirulentne szczepy, mogą wytwarzać dodatkowo toksynę binarną CDT, o aktywności aktyno-zależnej ADP-rybozylotransferazy. Głównym objawem zakażenia *C. difficile* jest wodnista biegunka o różnym nasileniu, może także wystąpić ból brzucha i gorączka oraz w cięższych przypadkach charakterystyczny obraz endoskopowy jelita grubego w postaci tzw. błony rzekomej. Rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego jest poważaną chorobą, która nieleczona może prowadzić do ciężkiego zapalenia jelita grubego z niedrożnością jelit, posocznicy i wstrząsu, co z kolei może spowodować śmierć pacjenta. Standardowe leczenie zakażeń *Clostridioides* za pomocą antybiotyków takich jak metronidazol, wankomycyna lub fidaksomycyna u części chorych jest nieskuteczne i prowadzi do nawrotów choroby (54). Odmienny skład jelitowej mikrobioty w tym stan dysbiozy może sprzyjać zakażeniu *Clostridioides difficile* oraz innymi patogenami, a nawet powodować zaostrzenie objawów choroby. Prawidłowa, wysoce zróżnicowana mikrobiota jelit chroni przed nawrotami CDI, należy więc dążyć do jej odbudowania. Od kilku lat z powodzeniem stosowany jest przeszczep mikrobioty kałowej (ang. fecal microbiota transplantation - FMT), który przywraca prawidłowy skład mikroflory jelitowej pacjenta. Zgodnie z polskimi zaleceniami ekspertów Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków metodę tą należy stoso-

wać w przypadku pacjentów z co najmniej trzecim nawrotem choroby (54). Temat przeszczepu mikrobioty jelitowej został szerzej opisany w dalszej części artykułu.

OTYŁOŚĆ I NADWAGA

Według ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (ang. WHO – World Health Organization) otyłość stanowi istotny problem zdrowotny, ekonomiczny i społeczny. Szczególnie w krajach rozwiniętych choroba ta stanowi prawdziwą epidemię XXI wieku. W 2016 roku wg WHO prawie 2 miliardy dorosłych ludzi na świecie (około 40% populacji) cierpiało na nadwagę a około 650 milionów na otyłość (11% mężczyzn i 15% kobiet) (115). Według Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) z 2014 r. w Polsce osoby w wieku powyżej 15 lat z nadwagą i otyłe stanowiły odpowiednio 36,6% i 16,7% populacji, ponadto odsetek osób z tego typu nieprawidłowościami w naszym kraju stale rośnie (118). Otyłość jest czynnikiem ryzyka wielu innych chorób takich jak nadciśnienie, powikłania sercowo-naczyniowe, udar mózgu, bezdech senny, choroby zwyrodnieniowe stawów, cukrzyca typu II, depresja i nowotwory. Głównym czynnikiem sprawczym nadwagi i otyłości jest przyjmowanie zbyt dużej ilości kalorii w stosunku do ilości kalorii zużywanych przez organizm (zachwianie bilansu energetycznego). Wiele dodatkowych czynników wpływa na zwiększenie masy ciała człowieka, szczególnie nieaktywny tryb życia, spożywanie żywności bogatej w proste węglowodany, nieodpowiednie godziny spożywania pokarmu i czynniki genetyczne. Postuluje się także udział zaburzeń mikrobioty w rozwoju otyłości (8, 36, 58). Szczególnie interesujące okazały się eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. W jednym z wielu tego typu badań przeniesiono mikrobiotę otyłych myszy DIO (DIO - diet-induced obesity) do mysz gnobiotycznych o prawidłowej masie ciała, co doprowadziło do powstania u szczupłych myszy podobnych zmian jak u mysz otyłych (100). Wpływ mikrobioty na gospodarkę węglowodanów i tłuszczy odbywa się na wielu poziomach w zależności od obecności korzystnej lub niekorzystnej flory bakteryjnej. W licznych badaniach naukowych stwierdzono różny skład i zróżnicowanie mikrobioty u osób szczupłych i otyłych oraz niższe zróżnicowanie mikrobioty u osób otyłych (8, 32, 48, 58). *Million* i wsp. w badaniach wykonanych techniką Real Time PCR dotyczących wybranych mikroorganizmów u otyłych i szczupłych dorosłych osób zaobserwowali zwiększony udział *Methanobrevibacter smithii* i *Bifidobacterium animalis* u osób szczupłych natomiast *Lactobacillus reuteri* był liczniejszy u osób otyłych (58). W wielu badaniach stwierdzono zależność zwiększonego udziału bakterii z rodziny *Christensenellaceae* u osób szczupłych względem osób otyłych (32). *Bervoets* i wsp. w badaniach, w których analizie poddano skład mikrobioty jelita u otyłych i szczupłych dzieci stwierdzili, że dieta bogata w tłuszcze i proste węglowodany powoduje wzrost ilości mikroorganizmów zaliczanych do gromady *Firmicutes* w stosunku do *Bacteroidetes* (8). Autorzy zaobserwowali także u otyłych dzieci zwiększoną obecność drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* i jednoczesne zmniejszenie ilości bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Obecność większej ilości bakterii należących do gromady *Firmicutes* prawdopodobnie umożliwia zwiększone pozyskiwanie energii z pokarmu m.in. przez zwiększona produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych SCFA. Związki te są nie tylko źródłem energii dla komórek nabłonkowych jelita ale stanowią także źródło energii dla całego organizmu człowieka odpowiadając za dodatkowe ok. 200 kcal/dzien-

nie (48). Propioniany są wchłaniane przez wątrobę gdzie są wykorzystywane w cyklach glukoneogenezy, liponeogenezy i syntezy białek, natomiast octany są wykorzystywane przez komórki różnych tkanek i są substratem do syntezy cholesterolu. U osób otyłych zaobserwowano obecność większego stężenia SCFA ze zwiększonym udziałem propionianów w porównaniu z osobami o prawidłowej wadze ciała. (85). SCFA aktywują receptory związane z białkiem G (GPR – G Protein Coupled Receptor) co wpływa na wydzielanie peptydu PYY, który spowalnia pasaż jelitowy i zwiększa poziom pobranej z pokarmu energii ale też wpływa na uczucie sytości. Część naukowców uważa, że dysbioza poprzez uszkodzenie integralności błony śluzowej jelita i nabłonka jelita (tzw. „leaky gut" – przepuszczalne jelita/ jelito przesiąkliwe) powoduje przenikanie do krwioobiegu niektórych składników komórkowych bakterii jak LPS (lipopolisacharyd wchodzący w skład błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych), co może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego. Stan taki objawiający się m.in. podniesionym poziomem białka C-reaktywnego, niektórych cytokin i interleukin oraz czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF-α) łączony jest z nadwagą i otyłością (42). Badania Cani i wsp. przeprowadzone na myszach dowiodły, że już 4-tygodniowe wlewy roztworu zawierającego LPS doprowadził do podwyższenia wagi ciała, rozwoju stłuszczenia wątroby, stężenia glukozy we krwi i insulinooporności podobnie jak u myszy karmionych przez 4 tygodnie dietą wysokotłuszczową (11). W badaniach na modelu mysim dowiedziono także, że otyłość połączona z nieprawidłową mikroflorą może przyczynić się do modyfikacji ekspresji niektórych genów w komórkach jelita m.in. na drodze epigenetycznej acetylacji i metylacji, co z kolei może być powodem rozwoju chorób wiązanych z otyłością (72). Kolejnym ważnym czynnikiem badanym w ostatnich latach, któremu przypisuje się ważną rolę m.in. w regulacji metabolizmu energetycznego człowieka jest arylowy receptor węglowodorowy (AHR – aryl hydrocarbon receptor). Receptor ten wpływa na ekspresję skorelowanych z metabolizmem białek kodowanych przez m.in. geny: *CYP1B1, PPARα, SCD1 i SPP1* przez co jest brany pod uwagę jako potencjalny cel terapeutyczny u osób otyłych i chorych na zespoły metaboliczne. Aktywacja receptorów AHR powoduje otyłość, a ich hamowanie jej zapobiega. Zablokowanie aktywności receptora AHR u myszy karmionych pokarmem wysokokalorycznym (tzw. „Western Diet") z dużą ilością tłuszczy zmniejszyło wagę myszy oraz zapobiegało otyłości i stłuszczeniu wątroby, podobnie do myszy karmionych dietą niskokaloryczną. Natomiast karmienie myszy dietą wysokokaloryczną bez zmian w działaniu receptora AHR prowadziło do ich otyłości (79). W aktywowaniu receptora AHR ważną rolę może pełnić flora bakteryjna. Niektóre gatunki bakteryjne poprzez metabolizm tryptofanu mogą aktywować receptory arylowe w komórkach odpornościowych jelita człowieka (31). Obecnie trwają intensywne badania w których poszukiwane są zależności między składem mikrobioty u osób otyłych i szczupłych, a procesem aktywacji i hamowania receptorów AHR oraz różnorodne badania nad innymi ludzkimi receptorami i metabolitami bakteryjnymi wpływającymi na nasz metabolizm.

CELIAKIA

Celiakia (choroba trzewna) to autoimmunologiczna choroba spowodowana nietolerancją organizmu człowieka na gliadynę, białko wchodzące w skład glutenu, występujące w ziarnach zbóż takich jak m.in. pszenica (68). Schorzenie to prowadzi do zaniku

kosmków jelitowych, co powoduje upośledzenie funkcji jelit. Objawy celiakii jak; ból i wzdęcia brzucha, biegunki, utrata masy ciała, osłabienie, anemia, występują w różnym wieku. Choroba jest uwarunkowana genetycznie i występuje u osób wykazujących obecność alleli HLA-DQ2 i/lub DQ8. Nadal niewyjaśnione są w pełni przyczyny powstania choroby. Niewiadome jest dlaczego celiakia może rozwinąć się w różnym etapie życia człowieka, pomimo wprowadzenia glutenu we wczesnym dzieciństwie, nie wyjaśniono także przyczyn rosnącego odsetka chorych w krajach zachodnich pomimo braku wzrostu spożycia pokarmów bogatych w gluten oraz powodu rozwoju choroby tylko u małego odsetka osób z genetyczną predyspozycją do celiakii (obecność alleli HLA-DQ2/8), która występuje u ponad 30% społeczeństwa (82). Stąd poszukiwanie innych czynników, które mogą wpływać na powstanie objawów choroby. Postuluje się wpływ mikrobioty na rozwój celiakii poprzez zaburzenie ilościowego i jakościowego składu flory bakteryjnej jelita. *Cristofori* i wsp. w pracy przeglądowej z 2018 roku zaobserwowali, że pomimo dużych różnic między stosowanymi w poszczególnych badaniach metodami analiz i liczbą badanych w nich osób zauważalne jest, że u osób chorujących na celiakię zachwiana jest równowaga w składzie mikrobioty między bakteriami kojarzonymi z wywoływaniem stanów zapalnych oraz pożytecznymi drobnoustrojami łagodzącymi te stany na korzyść tych pierwszych. W badaniach stwierdzono wzrost ilości bakterii Gram-ujemnych względem Gram-dodatnich a szczególnie wzrost odsetka *E. coli* i *Bacteroides* wobec spadku odsetka *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w porównaniu do składu mikrobioty osób zdrowych (68). U osób z celiakią zaobserwowano także zwiększoną ilość obligatoryjnych patogenów jak *Staphylococcus spp*., *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, i *Neisseria flavescens* oraz genów związanych z wirulencją w tym genów związanych z pozyskiwaniem żelaza (82). Badany jest także możliwy wpływ mikrobioty na dostępność immunogennego glutenu. Uważa się, że bakterie *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mogą pełnić rolę ochronną przed powstawaniem objawów celiakii ze względu na produkowany przez te bakterie enzym proteazę rozkładający gluten na mniejsze peptydy, które są mniej immunogenne dla jelit w porównaniu do glutenu. Z kolei *Pseudomonas aeruginosa* ze względu na produkcję elastazy zaostrza objawy chorobowe tej choroby (68, 82). *S*tan dysbiozy wpływający na przepuszczalność jelit także przyczynia się do przedostawania nie w pełni strawionej gliadyny do blaszki właściwej jelita. Postuluje się, że stosowanie u chorych na celiakię dokładnie wyselekcjonowanych probiotycznych szczepów bakteryjnych, o udowodnionych prozdrowotnych właściwościach, może wpłynąć na poprawę stanu zdrowia chorych, choć niewątpliwie wymaga to dalszych badań (68).

MIKROBIOTA A NOWOTWORY

Eksperci WHO wskazują, że drugim co do częstości powodem śmierci na świecie, po chorobach serca, z liczbą 9,6 mln przypadków w roku 2018, są nowotwory (114). Jest to bardzo zróżnicowana grupa chorób różnych narządów i części ciała człowieka. Wśród czynników powodujących powstanie nowotworu, poza zmianami genetycznymi, wymienia się czynniki: fizyczne (np. promieniowanie UV), chemiczne (np. azbest, alkohol, składniki dymu tytoniowego) i biologiczne (zakażenia patogennymi drobnoustrojami) (114). Związek niektórych mikroorganizmów z powstaniem nowotworów jest znany i potwierdzony w licznych badaniach naukowych. Uznanym czynnikiem etiologicznym,

drobnokomórkowego raka wątroby, raka żołądka, białaczki typu T dorosłych i raka szyjki macicy są odpowiednio wirusy *HCV* i *HBV*, pałeczki *Helicobacter pylori*, wirus *HTLV-1* oraz wirus *HPV*. Wśród nowotworów, trzecim co do częstości występowania na świecie po raku płuc i piersi jest rak jelita grubego. Za jeden z czynników sprawczych powstania nowotworu, poza nieodpowiednimi nawykami żywieniowymi, stylem życia i predyspozycjami genetycznymi uważa się dysbiozę wraz ze zmianą ilościową i jakościową mikrobioty, która jest związana z nieprawidłowym sposobem odżywiania (34, 57, 83, 91). Opublikowana w 2019 roku metaanaliza wykazała, że między innymi bakterie takie jak *Fusobacterium nucleatum, Bacteroides fragilis, Escherichia coli i Clostridium* są liczniejsze u osób z rakiem jelita grubego niż u osób zdrowych i mogą mieć wpływ na rozwój tego nowotworu (110). Bakterie te wytwarzają toksyny i inne czynniki zjadliwości, które mogą odgrywać krytyczną rolę w kancerogenezie. Szczególną rolę odgrywa przewlekły stan zapalny, który prowadzi do nadmiernej i długotrwałej odpowiedzi immunologicznej mogącej prowadzić do uszkodzenia nabłonka jelita. Przewlekły stan zapalny może także dodatkowo (promować) nadmierny wzrost bakterii patogennych jak np. genotoksycznych pałeczek *Escherichia coli* oraz *F. nucleatum*. Jak wykazano szczepy pałeczki *E. coli* posiadające zdolność do wytwarzania kolibaktyny (*pks+ E.coli*) mogą prowadzić do nowotworzenia (69). Kolibaktyna to genotoksyna, która powoduje uszkodzenia materiału genetycznego poprzez tworzenie dwuniciowych pęknięć łańcucha DNA, co może przyczyniać się do indukcji procesu kancerogenezy. *F. nucleatum* może przyłączać się do powierzchni i dokonać inwazji kolonocytów przy pomocy białka adhezyjnego FadA. Białko to łączy się i wytwarza kompleks z E-kadheryną i aneksyną A1 co wzmacnia szlak sygnałowy β-kateniny powodując nadekspresję czynników transkrypcyjnych i onkogenów. Kolejnym drobnoustrojem którego obecność jest wiązana z nowotworzeniem jest enterotoksynogenny *B. fragilis* produkujący metalproteazę, która m.in. wpływa na β-kateninę, co prowadzi do proliferacji enterocytów i zwiększenia przepuszczalności nabłonka jelitowego (34, 83). Omawiane powyżej mikroorganizmy mogą tworzyć mikrośrodowisko sprzyjające powstaniu raka jelita grubego, jednak pośród wielu różnorodnych gatunków bakteryjnych zamieszkujących przewód pokarmowy człowieka znajdują się także takie, które chronią nas przed powstaniem tego nowotworu. Eksperci Amerykańskiego Instytutu Badawczego nad Rakiem (American Institute for Cancer Research – AICR) oraz Światowej Fundacji Badań nad Rakiem (World Cancer Research Fund – WCRF) wskazują, że dieta bogata w błonnik może chronić przed zachorowaniem na raka jelita grubego (113). Błonnik pokarmowy stanowi źródło pokarmu dla bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które pozytywnie wpływają na proliferację enterocytów i homeostazę immunologiczną. Ponadto błonnik zwiększa objętość treści jelitowej, wiążąc potencjalne kancerogeny oraz zmniejszają czas tranzytu masy kałowej przez jelita co skraca czas kontaktu szkodliwych substancji z błoną śluzową jelita (raport WCFR). Następnym przykładem korelacji między stanem mikrobiomu, a nowotworzeniem jest wpływ składu mikrobioty jelitowej na leczenie immunologiczne nowotworów przeciwciałami anty PD1 i PD-L1. Komórki nowotworowe posiadają zdolność ucieczki spod kontroli immunologicznej, wykorzystując w tym celu punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej (checkpoints) PD1. Punkty kontroli u zdrowych ludzi umożliwiają m.in. unikanie odpowiedzi komórek odpornościowych przeciw własnym prawidłowym komórkom ciała. Ligandy PDL1 na powierzchni komórek nowotworowych łączą się z receptorami PD1 na

limfocytach T hamując ich aktywność i wytwarzanie cytokin. Odblokowanie receptorów PD1 za pomocą przeciwciał monoklonalnych anty PD-1 i anty PD-L1 umożliwia ich aktywację przeciw antygenom nowotworowym, co umożliwia eliminację komórek nowotworowych przez komórki odpornościowe organizmu. W ostatnich latach prowadzonych jest wiele badań naukowych, które mają na celu określnie wpływu mikrobioty, stosowanej antybiotykoterapii i probiotyków na skuteczność leczenia inhibitorami PD1 i PD-L1 (77, 80, 116). *Routy* i wsp. dowodzą, że stosowanie antybiotyków jest związane ze słabą odpowiedzią na leczenie inhibitorami przeciwko immunologicznym punktom kontroli (80). Autorzy przeprowadzili doświadczenie na wolnych od drobnoustrojów myszach chorych na nowotwory oraz myszach leczonych antybiotykami, którym przeszczepiono kał od ludzi chorych na nowotwory reagujących na leczenie lub na nie opornych. Stwierdzono, że przeciwnowotworową skuteczność leczenia przeciwciałami anty-PD1 wykazywały myszy, u których przeszczepiono kał wraz z mikroflorą od chorych odpowiadających na leczenie. Najbardziej istotne w procesie odpowiedzi na leczenie immunologiczne okazały się bakterie *A. municiphilia*. Zwiększona ilość tej bakterii w kale osób z nowotworem była wykrywana u osób pozytywnie odpowiadających na leczenie. Wśród innych pożytecznych dla terapii immunologicznej bakterii wymienia się gatunki z rodzaju *Bifidobacterium* i *Bacteroides* oraz gatunki *Enterococcus hirae, E. faecium* i *Burholderia cepacia* (77). Potrzebne są dalsze badania nad przyczynami powstawania nowotworu jelita grubego jak również wpływu mikrobioty na leczenie różnych nowotworów.

ALERGIE POKARMOWE

Alergie to choroby charakteryzujące się nadmierną reakcją ze strony układu odpornościowego człowieka po kontakcie z alergenem. Nieprawidłowa odpowiedź ze strony tego układu powoduje zaburzenia w obrębie różnych narządów i układów w organizmie człowieka. Wśród alergenów pokarmowych najczęściej wymienia się jaja kurze i mleko krowie. W ostatnich latach stwierdza się wzrost zachorowań na alergie szczególnie u dzieci. Zaobserwowano różnice w składzie mikrobioty jelitowej u osób z alergiami w porównaniu do osób zdrowych. *Fazlollahi* i wsp. stwierdzili w grupie 141 dzieci w wieku od 3 do 16 miesięcy z alergią na kurze jaja znaczne różnice w ilości bakterii - zwiększoną ilość bakterii należących do rodzin *Lachnospiraceae, Streptococcaceae* i zmniejszoną ilość *Leuconostocaceae* u dzieci z alergią w stosunku do dzieci zdrowych (25). Natomiast w badaniach *Berni Canani* i wsp. u dzieci z alergią na mleko krowie zaobserwowano większy udział bakterii z rodzin *Lachnospiraceae*, Ruminococcaceae, *Blautia, Roseburia* i *Coprococcus* (7). Postuluje się wpływ składu mikrobioty, szczególnie w okresie wczesnego dzieciństwa, na rozwój niektórych alergii. Wykazano związek między składem mikroflory w okresie niemowlęcym a rozwojem alergii pokarmowych. *Azad* i wsp. w badaniach niemowląt w wieku od 3 miesięcy do 1 roku życia z alergią na przynajmniej jeden składnik pokarmowy wykazali zwiększony udział bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae,* a zmniejszony udział *Bacteroidaceae* (4). Ponadto autorzy zaobserwowali zmniejszone bogactwo mikroflory u dzieci z alergiami. Badania naukowe dowodzą, że odpowiedni skład mikrobioty jelitowej i jej metabolity oraz wczesna ekspozycja na ewentualne alergeny (różnorodne składniki pokarmowe) mają podstawowy wpływ na ustalenie tolerancji immunologicznej na alergeny pokarmowe (1). Wpływ na rozwinięcie objawów alergii ma

m.in. niedobór jelitowych limfocytów T regulatorowych (Treg) lub ich nieodpowiednia indukcja. Limfocyty te są indukowane przez mikrobiotę i odpowiadają w zależności od subpopulacji, m.in. za wytwarzanie jądrowych czynników transkrypcyjnych np. RORγt, które wpływają na tolerancję na mikroflorę oraz wytwarzanie interleukiny 10, która odgrywa dużą rolę w regulacji procesu zapalnego (1, 64). Uważa się także, że duży wpływ na powstanie niektórych alergii ma nieodpowiednio wykształcona odpowiedź ludzkiego układu odporności na czynniki zewnętrzne. Tak zwana hipoteza „higieniczna" sformułowana przez *Strachana* tłumaczy, że za zwiększoną w ostatnich dekadach liczbę alergii odpowiada znaczna poprawa poziomu higieny i życie w niemal „sterylnych" warunkach (93). Odsetek chorób autozapalnych w krajach ubogich jest znacznie niższy niż w krajach wysoce rozwiniętych. Postuluje się, że kontakt z alergenami oraz patogenami bakteryjnymi i pasożytami we wczesnym dzieciństwie może odpowiednio modulować nasz układ odpornościowy i następnie zmniejszać w okresie dorosłym ryzyko wystąpienia skłonności do alergii. Zaobserwowano, że m.in. w rodzinach z dużą liczbą dzieci, młodsze dzieci, które mają częsty „niehigieniczny" kontakt ze starszym rodzeństwem rzadziej chorują na choroby alergiczne takie jak np. katar sienny. Podobnie, mniej chorób alergicznych zaobserwowano w rodzinach żyjących w środowisku wiejskim, posiadających zwierzęta domowe oraz u dzieci uczęszczających do przedszkoli (92). Obecnie prowadzonych jest wiele badań mikrobioty u osób z alergiami, co w przyszłości może pozwolić na opracowanie nowych rekomendacji dotyczących leczenia jak i zapobiegania tej grupy chorób.

ZABURZENIA PSYCHICZNE

Wiele badań naukowych sugeruje, że mikrobiom jelitowy może wpływać na zdrowie psychiczne człowieka (29, 40, 87, 94, 105). Uważa się, że mikrobiota ma wpływ na ośrodkowy układ nerwowy poprzez oś komunikacji „mikrobiota-jelito-mózg" (105). Zachwianie równowagi składu mikrobioty (dysbioza) łączy się z objawami depresji, autyzmu, zaburzeń lękowych, anoreksji, choroby Parkinsona i Alzheimera. Bakterie produkują bądź pośredniczą w produkcji szeregu substancji w tym acetylocholiny, melatoniny, serotoniny (metabolizm tryptofanu), kwasu gammamasłowego, histaminy, SCFA oraz neurotoksyn, które pośrednio lub bezpośrednio mogą wpływać na ośrodkowy układ nerwowy. Wiele badań wskazuje, że zdrowa dieta jak np. dieta śródziemnomorska powiązana jest z dobrym nastrojem i chroni przed depresją. Jednocześnie dieta ta pozytywnie wpływa na mikrobiom promując namnażanie pożytecznych dla organizmu człowieka mikroorganizmów (40). Szczególne zainteresowanie naukowców budzi korelacja mikrobioty i chorób ze spektrum autyzmu (ASD). U niemal połowy przypadków dzieci z ASD stwierdza się różnego rodzaju objawy gastryczne jak zaparcia i biegunki (38). *Strati F* i wsp. zaobserwowali u osób z ASD wzrost odsetka *Firmicutes* względem *Bacteroides* w tym rodzajów *Collinsella, Corynebacterium, Dorea,* i *Lactobacillus* (94). Jednocześnie stwierdzono także obniżony odsetek rodzajów *Alistipes, Bilophila, Dialister, Parabacteroides i Veillonella*. Autorzy zaobserwowali także u autystycznych dzieci z zaparciami znaczny wzrost ilości bakterii z rodzajów *Escherichia*, *Clostridium* klaster XVIII oraz grzybów z rodzaju *Candida*. U dzieci z autyzmem stwierdzono również niższy poziom SCFA wytwarzanych przez pożyteczne rodzaje bakterii w porównaniu do populacji ogólnej. Zaobserwowano także nasilenie objawów autyzmu u osób z cięższymi objawami gastrycznymi (29). Część

naukowców uważa, że zwiększona przepuszczalność jelit i przedostawanie się metabolitów bakteryjnych do krwi a następnie do mózgu może odgrywać rolę w rozwoju objawów choroby. W badaniach wykazano, że u osób z autyzmem występuje zwiększoną ilość zonuliny, białka odpowiedzialnego za regulacje połączeń komórkowych między komórkami nabłonka jelita cienkiego (23). W badaniach przeprowadzonych przez *Fiorentino* i wsp. zaobserwowano z kolei zmienioną ekspresję genów związanych z barierą krew-mózg w przypadku osób z ASD (27). Mogłoby to umożliwić dostęp substancji neurotoksycznych przenoszonych przez krew do tkanki mózgowej chorych osób. *Seo* i wsp. w pracy przeglądowej dotyczącej zespołu Alzheimera z 2020 roku także postulują możliwość wpływu dysbiozy na rozwój stanu zapalnego, co w konsekwencji ma prowadzić do powstania neurozapalnych zmian w mózgu (87). Zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg oraz umożliwienie wnikania czynników zapalnych i fragmentów bakterii do mózgu ma powodować nadmierną aktywację komórek mikrogleju a w konsekwencji zaostrzenie neurodegeneracji (87). Konieczne są dalsze badania wpływu mikrobioty na zespoły neurodegeneracyjne.

PRZYSZŁOŚĆ BADAŃ NAD MIKROBIOMEM

Światowa Organizacja zdrowia (WHO) definiuje zdrowie nie tylko jako brak choroby lub kalectwa ale także jako stan pełnego fizycznego, psychicznego i społecznego dobrostanu. Na dobrostan ten może mieć wpływ m.in. mikrobiota człowieka. Przytoczone powyżej przykłady wskazują na duży wpływ mikroflory jelitowej na nasze zdrowie, stąd zainteresowanie wykorzystaniem badania stanu zdrowia za pośrednictwem analizy mikrobiomu. Nieinwazyjne i nie niosące żadnego ryzyka zdrowia dla pacjenta badanie mikrobioty, połączone z wynikami innych badań, skonsultowane z lekarzem lub dietetykiem mogą umożliwić odpowiednią, spersonalizowaną diagnostykę różnych dolegliwości. Kluczowa wydaje się odpowiednia standaryzacja badań mikrobioty. Poszukiwane są markery mikrobiologiczne określające prawidłową i prozdrowotną mikrobiotę (3, 108). *Almonacid* z zespołem w badaniach mikrobioty kału przeprowadzonych z zastosowaniem sekwencjonowania techniką NGS u 897 zdrowych osób wskazali kluczowe znaczenie 28 jednostek taksonomicznych (14 gatunków i 14 rodzajów bakteryjnych) dzieląc je na 20 częstych komensalnych, 3 prozdrowotnych i 5 chorobotwórczych gatunków lub rodzajów drobnoustrojów (3). Autorzy sugerują, że celowane badania ilościowe tych właśnie drobnoustrojów mogą stanowić przykład zdrowej, referencyjnej mikrobioty jelitowej człowieka i mogą być wykorzystane w diagnostyce klinicznej. Na rynku diagnostycznym w Polsce dostępne są już komercyjne badania mikrobiomu, określające skład i zróżnicowanie mikroflory, choć często oparte są na klasycznych posiewach mikrobiologicznych, zamiast na technice sekwencjonowania NGS, przez co mało prawdopodobne jest uzyskanie w nich rzetelnej informacji o składzie mikrobioty jelitowej badanej osoby. Poza ustaleniem składu mikroflory, kluczowa jest możliwość jej „naprawy", stąd badania nad modulowaniem składu mikroflory, a co za tym idzie zapobieganiem i leczeniem wielu chorób, których podłożem są zaburzenia mikrobioty. Szczególne zainteresowanie wśród naukowców budzi transfer mikrobioty jelitowej między osobą zdrową a chorą. Pierwsze doniesienia o przeniesieniu kału chorym od osoby zdrowej pochodzą z Chin z czwartego wieku naszej ery. Ge Hong opisał podawanie roztworu kału ludzkiemu osobom z zatru-

ciem lub ostrą biegunką (120). Obecnie transfer mikrobioty kałowej (FMT - fecal microbiota transplantation) szczególnie znalazł zastosowanie w leczeniu zakażeń laseczką *C. difficile* (CDI – *Clostridioides difficile* infection). W celu odtworzenia tzw. stanu eubiozy czyli prawidłowego składu jakościowego i ilościowego mikrobioty u chorych na CDI, zaczęto stosować przeszczep flory bakteryjnej, który polega na transferze kału od zdrowego dawcy do jelita chorego biorcy (35). Różnorodne bakterie bytujące w przeszczepianym kale mogą wypierać laseczki *Clostridioides* zajmując dotychczasową niszę tej bakterii w jelicie chorego, ponadto prawidłowa mikrobiota poprzez produkcję różnego rodzaju metabolitów zmienia warunki środowiskowe na niekorzystne dla *C. difficile*. Zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych (Infectious Diseases Society of America – IDSA) przeszczep mikrobioty powinien być rozważany szczególnie u osób z co najmniej trzecim nawrotem zakażenia *C. difficile*. Podobnie zalecenia Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – ESCMID) z 2018 roku oraz polskich rekomendacji Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, dotyczących diagnostyki, leczenia i profilaktyki zakażeń *Clostridium difficile* rekomendują stosowanie przeszczepu mikrobioty jelitowej u chorych z wielokrotnym nawrotem CDI u których nie powiodło się leczenie antybiotykami (54). Metoda FMT z eksperymentu medycznego przeistoczyła się w poważną opcję terapeutyczną. Liczne badania naukowe dowodzą, że przeszczep mikrobioty jest bezpiecznym i wysoce efektywnym sposobem terapii nawracających CDI, ze skutecznością sięgającą 90% (106). Obecnie brak jest jednak rekomendacji dotyczących przygotowania transferu kału jak i jego przeprowadzenia. Standardowo wykonuje się zawiesinę kału w soli fizjologicznej od zdrowego dawcy, choć używany jest także liofilizowany kał w kapsułkach. Obecnie prowadzone są liczne badania naukowe dotyczące stosowania FMT do leczenia innych chorób jak: choroby Crohna, zespołu jelita drażliwego, zakażeń wielolekoopornymi bakteriami czy otyłości (39, 56). Kolejnymi ważnymi czynnikami modulującymi mikroflorę są probiotyki i prebiotyki (37, 76, 122). Prowadzone są różnorodne badania na modelach zwierzęcych i kontrolowane badania kliniczne z udziałem chorych ludzi wykorzystujące te substancje w leczeniu ludzi. Szczególnie zainteresowanie budzą probiotyki (37, 70). Mianem tym określamy żywe mikroorganizmy, które po spożyciu przez człowieka dają mu korzyści zdrowotne. Aktualnie najczęściej stosowanymi są szczepy bakterii takich jak *Lactobacillus spp*., *Bifidobacterium spp.* oraz drożdże – *Saccharomyces* spp. Probiotyki posiadają udowodnione kliniczne zastosowanie w leczeniu biegunki podróżnych. Prowadzone są prace nad wykorzystaniem jako probiotyków szczepów bakterii, które w badaniach mikrobiomu stwierdzono u osób zdrowych, a brak ich występowania lub znaczące zmniejszenie ilości wykryto u osób chorych np. *Akkermansia* sp. i *Facelibacterium* sp. (53, 119). Modulowanie mikrobioty jest także możliwe przez spożywanie prebiotyków czyli substancji, które nie ulegają trawieniu jednak stanowią pokarm dla pożytecznych mikroorganizmów bytujących w jelicie grubym człowieka (37). Dieta bogata w warzywa, owoce, zboża i orzechy zawiera dużo prebiotycznych związków takich jak: inuliny, fruktany, galaktooligosacharydy, fruktooligosacharydy oraz skrobia oporna. Postuluje się regularne spożywanie produktów bogatych w te substancje co z kolei ma wpływać na obfitość pożytecznych mikroorganizmów jelitowych (122). Kolejną grupą produktów pokarmowych promujących rozwój pożytecznych mikroorganizmów i działających korzystnie na pracę przewodu pokarmowego są

kiszonki i mleczne produkty fermentowane. Stanowią one naturalny synbiotyk czyli substancje łączącą prebiotyk i probiotyk w jednym produkcie. Spożywanie warzywnych i owocowych kiszonek oraz fermentowanych produktów mlecznych jak kefir, jogurt czy maślanka ma pozytywnie wpływać na cały organizm ludzki. Dodatkowo w celu ochrony zdrowia i jednocześnie poprawy różnorodności pożytecznej mikroflory zalecane jest unikanie spożywania wysoce przetworzonej, bogatej w cukry proste i tłuszcze zwierzęce żywności, odpowiedni wypoczynek i sen oraz uprawianie ćwiczeń (6, 24, 60, 73, 122).

Niewątpliwe jest, że mikrobiota jelitowa pełni wiele korzystnych funkcji w organizmie człowieka wpływając na nasz dobrostan. Jednak pomimo dużych postępów w badaniach mikroflory jelitowej nadal brakuje nam pełnej wiedzy o jej wpływie na nasze zdrowie. Obecnie największe wyzwanie stanowi brak wzorców zdrowej mikrobioty jak i dysbiozy głównie ze względu na duże zróżnicowanie mikroflory w populacjach a nawet u indywidualnych pacjentów w danej populacji. Mimo to każdy kolejny rok badań naukowych przybliża nas do pełnego poznania sieci powiązań pomiędzy bogatym światem drobnoustrojów a naszym organizmem, co pozwoli na wykorzystanie diagnostyki mikrobioty do zapobiegania i leczenia wielu chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aitoro R, Paparo L, Amoroso A* i inni. Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. Nutrients. 2017;9(7):672.
2. *Almeida A, Mitchell AL, Boland M* i inni. A New Genomic Blueprint of the Human Gut Microbiota. 2019;568(7753):499-504.
3. *Almonacid DE, Kraal L, Ossandon FJ* i nni. 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. PLoS One. 2017 May 3;12(5):e0176555.
4. *Azad MB, Konya T, Guttman DS*. i inni CHILD Study Investigators. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. Clin Exp Allergy. 2015 Mar;45(3):632-43.
5. *Balvočiūtė M, Huson DH.* SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? BMC Genomics. 2017;18(Suppl 2):114.
6. *Benedict C, Vogel H, Jonas W* i inni. Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals, Molecular Metabolism, 2016; 5(12):1175-86.
7. *Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT* i inni. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 2016;10(3):742-50.
8. *Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I* i inni. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. Gut Pathog. 2013; 30;5(1):10.
9. *Brestoff JR i Artis D*. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. Nat. Immunol. 2013;14:676–684.
10. *Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S.* The developing gut microbiota and its consequences for health. J Dev Orig Health Dis. 2018;9(6):590-97.

11. *Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M* i inni. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007;56(7):1761-72.
12. *Chen ML, Yi L, Zhang Y* i inni. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. mBio. 2016;7(2).
13. *Cheng M* i *Ning K*. Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas, Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2019;17(1):4-12.
14. *Claassen S, du Toit E, Kaba M* i inni. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. J Microbiol Methods. 2013;94(2):103-110.
15. *Colquhoun C, Duncan M, Grant G.* Inflammatory Bowel Diseases: Host-Microbial-Environmental Interactions in Dysbiosis. Diseases. 2020;10;8(2):13.
16. *Copy Chassaing B, Koren O, Goodrich JK* i inni. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. Nature. 2015;519(7541):92-6.
17. *D'Argenio V, Salvatore F.* The role of the gut microbiome in the healthy adult status. Clin Chim Acta. 2015;451:97-102.
18. *De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M* i inni. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:33.
19. *De Moraes AC, Fernandes GR, da Silva IT* i inni. Enterotype May Drive the Dietary-Associated Cardiometabolic Risk Factors. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:47.
20. *Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM* i inni. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. Cell. 2016;167(5):1339-53.e21.
21. *Dethlefsen L, Relman DA.* Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(Suppl 1):4554-61.
22. *Ding L, Chang M, Guo Y* i inni. Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis is associated with bile acid metabolism. Lipids Health Dis. 2018;17(1):286.
23. *Esnafoglu E, Cırrık S, Ayyıldız SN* i inni. Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. J Pediatr. 2017;188:240-44.
24. *Evans CC, LePard KJ, Kwak JW* i inni. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. PLoS One. 2014;9(3):e92193.
25. *Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A* i inni. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy.* 2018;73(7):1515-24.
26. *Feng Y, Huang Y, Wang Y* i inni. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy.PLoS One. 2019;14(6):e0218384.
27. *Fiorentino M, Sapone A, Senger S* i inni. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. Mol Autism. 2016;7:49.
28. *Fouhy F, Clooney AG, Stanton C* i inni. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. BMC Microbiol. 2016;16(1):123.

29. *Fowlie G, Cohen N, Ming X*. The Perturbance of Microbiome and Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders. Int J Mol Sci. 2018;19(8):2251.
30. *Gill SR, Pop M, Deboy RT* i inni. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science. 2006;312(5778):1355-9.
31. *Girer NG, Tomlinson CR, Elferink CJ*. The Aryl Hydrocarbon Receptor in Energy Balance: The Road from Dioxin-Induced Wasting Syndrome to Combating Obesity with Ahr Ligands. Int J Mol Sci. 2020;22(1):49.
32. *Goodrich JK, Davenport ER, Clark AG, Ley RE*. The Relationship Between the Human Genome and Microbiome Comes into View. Annu Rev Genet. 2017;51:413-33.
33. *Goodrich JK, di Rienzi SC, Poole AC* i inni. Conducting a microbiome study. Cell. 2014;158(2):250-262.
34. *Grazioso TP, Brandt M, Djouder N*. Diet, Microbiota, and Colorectal Cancer. iScience. 2019;21:168-87.
35. *Gupta A, Saha S, Khanna S.* Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future. World J Gastroenterol. 2020;26(8):777-88.
36. *Harsch IA, Konturek PC.* The Role of Gut Microbiota in Obesity and Type 2 and Type 1 Diabetes Mellitus: New Insights into "Old" Diseases. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(2):32.
37. *Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA.* Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. Nutrients. 2019 Jul 16;11(7):1613.
38. *Holingue C, Newill C, Lee LC* i inni. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. Autism Res. 2018 Jan;11(1):24-36.
39. *Hsu WH, Wang JY, Kuo CH*. Current applications of fecal microbiota transplantation in intestinal disorders. Kaohsiung J Med Sci. 2019;35:327-31.
40. *Huang Q, Liu H, Suzuki K* i inni. Linking What We Eat to Our Mood: A Review of Diet, Dietary Antioxidants, and Depression. Antioxidants (Basel). 2019;8(9):376.
41. *Hughes DA, Bacigalupe R, Wang J* i inni. Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. 2020. Nat Microbiol. 5, 1079-87.
42. *Janczy J, Kochan Z, Małgorzewicz S.* Endotoksemia i zaburzenia bariery jelitowej towarzyszące nadwadze i otyłości. Post Mikrobiol. 2019; 58 (4): 427-32.
43. *Jha AR, Davenport ER, Gautam Y* i inni. Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. PLoS Biol. 2018 Nov 15;16(11):e2005396.
44. *Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C.* Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. Nutr. Rev. 2015; 73: 426–37.
45. *Kachrimanidou M, Tsintarakis E.* Insights into the Role of Human Gut Microbiota in *Clostridioides difficile* Infection. Microorganism*s*. 2020;8(2):200.
46. *Kennedy NA, Walker AW, Berry* SH i inni. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. PLoS One. 2014;9(2):e88982.
47. *Khosravi A i Mazmanian SK.* Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. Curr. Opin. Microbiol. 2013;16:221–7.
48. *Kim KN, Yao Y, Ju SY.* Short chain fatty acids and fecal microbiota abundance in human with obesity:a systematic review and meta-analysis. Nutrients, 2019;11:1-14.

49. *Knezevic J, Starchl C, Tmava Berisha A, Amrein K*. Thyroid-Gut-Axis: How Does the Microbiota Influence Thyroid Function? Nutrients. 2020;12(6):1769.
50. *Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P* i inni. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. Clin Microbiol Infect. 2012;18(12):1185-93.
51. *Lederberg J., McCray A*. Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words. The scientist. 2001;15:8.
52. *Lobach AR, Roberts A, Rowland IR.* Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. Food Chem Toxicol. 2019;124:385-99.
53. *Martín R, Miquel S, Benevides L* i inni. Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. Front Microbiol. 2017;30;8:1226.
54. *Martirosian G, Hryniewicz W, Ozorowski* T i inni. Zakażenia *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile*: epidemiologia, diagnostyka, terapia, profilaktyka. W: Narodowy Program Ochrony Antybiotyków. 2018, Narodowy Instytut Leków.
55. *Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ.* Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. Cell. 2013;152(1-2):39-50.
56. *Mcilroy JR, Segal JP, Mullish BH* i inni. Current and future targets for faecal microbiota transplantation, Human Microbiome Journal. 2019:11.
57. *Messaritakis I, Vogiatzoglou K, Tsantaki K* i inni. The Prognostic Value of the Detection of Microbial Translocation in the Blood of Colorectal Cancer Patients. Cancers (Basel). 2020; 12(4):1058.
58. *Million M, Maraninchi M, Henry M* i inni. Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii. Int J Obes (Lond). 2012;36(6):817-25.
59. *Miyoshi J, Bobe AM, Miyoshi S* i inni. Peripartum Antibiotics Promote Gut Dysbiosis, Loss of Immune Tolerance, and Inflammatory Bowel Disease in Genetically Prone Offspring. *Cell Rep.* 2017;20(2):491-504.
60. *Monda V, Villano I, Messina A* i inni. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. Oxid Med Cell Longev. 2017:3831972.
61. *Nelkowska DD*. Treating irritable bowel syndrome through an interdisciplinary approach. Ann Gastroenterol. 2020;33(1):1-8.
62. *Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J.* How informative is the mouse for human gut microbiota research? Dis Model Mech. 2015;8(1):1-16.
63. *O'Hara AM; Shanahan F.* The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. 2006;7:688–93.
64. *Ohnmacht C.* Microbiota, regulatory T cell subsets, and allergic disorders. Allergo J Int. 2016;25(5):114-23.
65. *Ohno H.* Intestinal M cells. J Biochem. 2016;159(2):151-60.
66. *Oka A, Sartor RB.* Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. Dig Dis Sci. 2020;65(3):757-88.
67. *Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A* i inni. Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. Sci Rep. 2018;8(1):5143.

68. *Pecora F, Persico F, Gismondi P* i inni. Gut Microbiota in Celiac Disease: Is There Any Role for Probiotics?. *Front Immunol*. 2020;11:957.
69. *Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber* A i inni. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks^{+} E. coli. Nature. 2020 Apr;580(7802):269-273.
70. *Puebla-Barragan S, Reid G*. Forty-five-year evolution of probiotic therapy. Microb Cell. 2019:1;6(4):184-96.
71. *Qin J, Li R, Raes J,.Arumugam M* i inni. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;464(7285): 59-65,
72. *Qin Y, Roberts JD, Grimm SA* i inni. An obesity-associated gut microbiome reprograms the intestinal epigenome and leads to altered colonic gene expression. Genome Biol. 2018;19(1):7.
73. *Quiroga R, Nistal E, Estébanez B, Porras D* i inni. Exercise training modulates the gut microbiota profile and impairs inflammatory signaling pathways in obese children. Exp Mol Med. 2020; 52:1048–61.
74. *Radjabzadeh D, Boer CG, Beth SA* i inni. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. Nature research. Scientific reports. 2020. 10:1040.
75. *Rajilić-Stojanović M, de Vos WM*. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. FEMS Microbiol Rev. 2014;38(5):996-1047.
76. *Rajoka MSR, Shi J., Mehwish HM* i inni. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. Food Science and Human Wellness6, 2017:121-30.
77. *Rezasoltani S, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H* i inni Modulatory effects of gut microbiome in cancer immunotherapy: A novel paradigm for blockade of immune checkpoint inhibitors. Cancer Med. 2021;10(3):1141-54.
78. *Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F* i inni. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. Microorganisms. 2019; 7(1):14.
79. *Rojas IY, Moyer BJ, Ringelberg CS, Tomlinson CR*. Reversal of obesity and liver steatosis in mice via inhibition of aryl hydrocarbon receptor and altered gene expression of CYP1B1, PPARα, SCD1, and osteopontin. Int J Obes (Lond). 2020;44(4):948-63.
80. *Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM* i inni. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. Science. 2018;359(6371):91-7.
81. *Rowland I, Gibson G, Heinken A* i inni. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr. 2018;57(1):1-24.
82. *Sacchetti L, Nardelli C.* Gut microbiome investigation in celiac disease: from methods to its pathogenetic role. Clin Chem Lab Med. 2020;58(3):340-9.
83. *Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR* i inni. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. Mol Aspects Med. 2019;69:93-106.
84. *Schnorr SL, Candela M, Rampelli S* i inni. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. Nat Commun. 2014 Apr 15;5:3654.
85. *Schwiertz A, Taras D, Schäfer K* i inni. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity (Silver Spring). 2010;18(1):190-5.

86. *Sender R, Fuchs S, Milo R.* Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol. 2016;14(8).e1002533.
87. *Seo D-O., Holtzman DM, Masternak M.* Gut Microbiota: From the Forgotten Organ to a Potential Key Player in the Pathology of Alzheimer's Disease. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2020;75(7):1232–41.
88. *Shin JH, Jung S, Kim SA* i inni. Differential Effects of Typical Korean Versus American-Style Diets on Gut Microbial Composition and Metabolic Profile in Healthy Overweight Koreans: A Randomized Crossover Trial. Nutrients. 2019;11(10):2450.
89. *Smits SA, Leach J, Sonnenburg ED* i inni. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. Science. 2017 Aug 25;357(6353):802-6.
90. *Song EJ, Lee ES, Nam YD.* Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. J Microbiol. 2018;56(10):693-705.
91. *Song M, Chan AT.* Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention. Clin Gastroenterol Hepatol. 2019;17(2):275-89.
92. *Stiemsma LT, Reynolds LA, Turvey SE, Finlay BB.* The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. Immunotargets Ther. 2015;4:143-57.
93. *Strachan DP.* Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989;299(6710):1259-60.
94. *Strati F, Cavalieri D, Albanese D* i inni. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. Microbiome. 2017;5(1):24.
95. *Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G* i inni. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature. 2014;514(7521):181-6.
96. *Szewczyk E.* Aneks. Podłoża, próby i metody diagnostyczne. Schematy diagnostyczne. W: Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN. Red. *E. Szewczyk.* Warszawa 2019 ,wyd. 3, 505-73.
97. *Takakura W, Pimentel M.* Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome - An Update. Front Psychiatry. 2020;11:664.
98. *Tan X, Liu Y, Long J* i inni. Trimethylamine N-Oxide Aggravates Liver Steatosis through Modulation of Bile Acid Metabolism and Inhibition of Farnesoid X Receptor Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Mol Nutr Food Res. 2019 Sep;63(17):e1900257.
99. *Tong M, McHardy I, Ruegger P* i inni. Reprograming of gut microbiome energy metabolism by the FUT2 Crohn's disease risk polymorphism. ISME J. 2014;8(11):2193-206.
100. *Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI.* Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe. 2008;3(4):213-23.
101. *Uhr GT, Dohnalová L, Thaiss CA.* The Dimension of Time in Host-Microbiome Interactions. mSystems. 2019 Feb 19;4(1):e00216-18.
102. *Vangay P, Johnson AJ, Ward TL* i inni. US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. Cell. 2018 Nov 1;175(4):962-972.e10.
103. *Wacklin P, Tuimala J, Nikkilä J* i inni. Faecal microbiota composition in adults is associated with the FUT2 gene determining the secretor status. PLoS One. 2014;9(4):e94863.
104. *Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF.* The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? Pediatr Obes. 2017 Aug;12 Suppl 1(Suppl 1):3-17.

105. *Wang H-X i Wang Y-P*. Gut Microbiota-brain Axis. Chin Med J (Engl). 2016; 129(19): 2373-80.
106. *Wang JW, Kuo CH, Kuo FC* i inni. Fecal microbiota transplantation: Review and update. J Formos Med Assoc. 2019 Mar;118 Suppl 1:S23-S31.
107. *Weiss GA, Hennet T.* Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. Cell Mol Life Sci. 2017;74(16):2959-77.
108. *Wells JM, Brummer RJ, Derrien M* i inni. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2017;312(3):G171-G193.
109. *Winter SE, Bäumler AJ.* Dysbiosis in the Inflamed Intestine: Chance Favors the Prepared Microbe Gut Microbes. 2014;5(1):71-3.
110. *Wirbel J, Pyl PT, Kartal E* i inni. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. Nat. Med. 2019;25:679–89.
111. Włochal M i Grzymisławski M. Nowe trendy leczenia żywieniowego w przypadku nieswoistych chorób zapalnych jelit. Piel. Zdr. Publ. 2016; 6(2):149–58.
112. *Wojtuń S, Gil J, Szwed Ł, Dyrla P.* Podstawowe objawy i różnicowanie nieswoistych chorób zapalnych jelit. Pediatr Med Rodz 2014, 10 (1):61–6.
113. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer. Available at: wcrf.org/colorectal-cancer-2017. All CUP reports are available at wcrf.org/cupreports. 2017.
114. World Heath Organization (WHO). Światowa organizacja Zdrowia. Cancer sheets. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer
115. World Heath Organization (WHO). Światowa organizacja Zdrowia. Obesity and overweight. Fact sheets. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
116. *Yi M, Yu S, Qin S* i inni. Gut microbiome modulates efficacy of immune checkpoint inhibitors. J Hematol Oncol. 2018;11(1):47.
117. *Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J.* Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. *Front Nutr.* 2019;6:48.
118. *Zgliczyński WS.* Nadwaga i otyłość w Polsce. Wydawnictwo Sejmowe dla Biura Analiz Sejmowych, nr 4(227). 2017.
119. *Zhai Q, Feng S, Arjan N, Chen W.* A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(19):3227-36.
120. *Zhang F, Luo W, Shi Y* i inni. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? Am J Gastroenterol. 2012;107(11):1755; author reply p.1755-6.
121. *Zhu W, Gregory JC, Org E* i inni. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. Cell. 2016;165(1):111-24.
122. *Zmora N, Suez J, Elinav E.* You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019;16(1):35-56.
123. *King CH, Desai H, Sylvetsky AC* i inni. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard repartiny template. Plos one 2019;14(9) e.0206484.

Otrzymano: 4 V 2021
Adres Autora: 02-954 Warszawa, ul. Wiktorii Wiedeńskiej 9a, MEDGEN *Kamila Czerska* i wsp. Sp. K. Warszawa

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

W kwartalniku „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia” zamieszczane są prace doświadczalne i metodyczne z dziedziny mikrobiologii medycznej w zakresie zakażeń bakteryjnych, wirusowych, grzybicznych i zarażeń pasożytniczych oraz ich oddziaływania 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 maja 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 przesyłać 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.

Materiał 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 nieznanych, 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 pisemna 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). *Gałązka 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 poglądowe 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.