MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

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

1

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

MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA
Organ Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny i Polskiego Towarzystwa
Mikrobiologów

REDAKCJA

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

KOMITET REDAKCYJNY

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

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

Indeks 365226

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

NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO -
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

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

SPIS TREŚCI

PRACE ORYGINALNE

W. Waksmańska, A. Wiczkowski, R. Bobiński, A. Ślemp-Migiel. Zakażenia gronkowcowe w Podhalańskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II w Nowym Targu w latach 2001-2004 - analiza antybiotykooporności 5

M. Pomorska-Wesołowska, K. Małyszek, D. Romaniszyn, M. Pobiega, A. Szczypta, M. Dzikowska, A. Chmielarczyk, A. Różańska, J. Maciąg, J. Wójkowska-Mach. Molekularna charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zakażeń miejsca operowanego u pacjentów południowej Polski 15

W. Rastawicki, A. Chróst, K. Gielarowiec. Ocena przydatności opracowanego we własnym zakresie lateksowego testu aglutynacyjnego do poszukiwania przeciwciał dla antygenów pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* u osób z jersiniozą 27

J. Czepiel, M. Gomulska, G. Biesiada, I. Sobczyk-Krupiarz, R. Kisiel, A. Garlicki. Trudności w diagnostyce pełzakowatego ropnia wątrobowego 35

M. Rybka, M. Przybylski, P. Machura, T. Dzieciątkowski, R. Krenke, M. Wróblewska. Wykorzystanie serologicznych i molekularnych metod w diagnostyce pierwotnego ostrego zapalenia wątroby spowodowanego przez ludzki herpeswirus typu 6 – opis przypadku 43

B. Młynarczyk-Bonikowska, J. Muszyński, K. Szymanek-Majchrzak, B. Ziółkowski, G. Młynarczyk, M. Malejczyk, S. Majewski. Występowanie wirusów brodawczaka ludzkiego u pacjentów z polipami jelita grubego 49

PRACE POGLĄDOWE

A. Chróst, K. Gielarowiec, S. Kałużewski, W. Rastawicki. Występowanie zakażeń wywoływanych przez *Francisella tularensis* u ludzi w Polsce oraz laboratoryjna diagnostyka tularemii 55

Informacje Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów 64

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

W. Waksmańska, A. Wiczkowski, R. Bobiński, A. Ślemp-Migiel. Staphylococcus infection in a multi-profile hospital in Nowy Targ, Poland, in the years 2001-2004 - analysis of antibiotic resistance 5

M. Pomorska-Wesołowska, K. Małyszek, D. Romaniszyn, M. Pobiega, A. Szczypta, M. Dzikowska, A. Chmielarczyk, A. Różańska, J. Maciąg, J. Wójkowska-Mach. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical site infections of patients in southern Poland 15

W. Rastawicki, A. Chróst, K. Gielarowiec. Development and evaluation of a latex agglutination test for the detection of antibodies to *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in humans with yersiniosis 27

J. Czepiel, M. Gomulska, G. Biesiada, I. Sobczyk-Krupiarz, R. Kisiel, A. Garlicki. Diagnostic difficulties in amebic liver abscess 35

M. Rybka, M. Przybylski, P. Machura, T. Dzieciątkowski, R. Krenke, M. Wróblewska. Serological and molecular methods in diagnostics of primary acute hepatitis caused with human herpesvirus type 6 – a case report 43

B. Młynarczyk-Bonikowska, J. Muszyński, K. Szymanek-Majchrzak, B. Ziółkowski, G. Młynarczyk, M. Malejczyk, S. Majewski. The prevalence of human papillomaviruses in patients with colon polyps 49

REVIEWS

A. Chróst, K. Gielarowiec, S. Kałużewski, W. Rastawicki. The occurrence of infections caused by *Francisella tularensis* in humans in Poland and laboratory diagnosis of tularemia 55

Information of the Polish Society of Microbiologist 64

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 5 - 13

Zakażenia gronkowcowe w Podhalańskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II w Nowym Targu w latach 2001-2004 - analiza antybiotykooporności

Staphylococcus infection in a multi-profile hospital in Nowy Targ, Poland, in the years 2001-2004 - analysis of antibiotic resistance

Wioletta Waksmańska[1], Andrzej Wiczkowski[1], Rafał Bobiński[1], Anna Ślemp-Migiel[2]

[1]Wydział Nauk o Zdrowiu, Katedra Pielęgniarstwa i Ratownictwa Medycznego, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej,
[2]Podhalański Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II w Nowym Targu

Istotnym problemem jest leczenie infekcji wywołanych metycylinoopornymi szczepami z rodzaju *Staphylococcus* u szpitalnych pacjentów. Celem pracy była analiza częstości występowania zakażeń gronkowcowych w wieloprofilowym szpitalu w Nowym Targu, ze szczególnym zwróceniem uwagi na występowanie antybiotykooporności wśród szczepów *S. aureus* i oraz innych gronkowców opornych na metycylinę.

Słowa kluczowe: *biofilm bakteryjny, nosicielstwo, lekooporność, Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Introduction: Global concern is the treatment of infections caused by methicillin-resistant strains of genus *Staphylococcus*. The aim of this study was the analysis of the staphylococcal infections' incidence in a multi-profile hospital in Nowy Targ, Poland, in the years 2001-2004 with a focus on the occurrence of antimicrobial resistance among isolated strains of *S. aureus* and methicillin-resistant staphylococci.
Material and method: The study was based on the results of bacteriological tests performed in the hospital bacteriological laboratory. The study included patients treated in years 2001-2004 in cardiology, nephrology, surgery, orthopedics, pediatric, intensive care, gynecology and neonatal ward.
Results: Regardless of the year in which the analysis was performed, *S. aureus* strains resistant to methicillin were not cultured on the neonatal ward and gynecology ward. On the other side, methicillin-sensitive strains were cultured on all of the hospital`s wards. A very high sensitivity (virtually 100%) of staphylococcus to vancomycin and teicoplanin

and a high sensitivity (87-93%) to chloramphenicol was found. This study showed that the methicillin-resistant *Staphylococcus* strains were the least sensitive to tetracycline.
Conclusions: 1. The highest sensitivity of *Staphylococcus* was reported to glycopeptides and the lowest to tetracycline. 2. Most of the *Staphylococcus* strains were cultured in the cardiology department and the least of the strains in the department of gynecology. 3. It is advisable to check whether the frequency of *Staphylococcus* culture's occurrence has decreased after implementation of the WHO recommendations.

Keywords: bacterial biofilms, carriage, drug resistance, *Staphylococcus aureus*

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* to Gram-dodatnie ziarniaki, odpowiedzialne za liczne zakażenia o bardzo ciężkim przebiegu. Częstość występowania zakażeń wzrasta szczególnie u osób z obniżoną odpornością. Znane są 32 gatunki tych bakterii, z czego 16 izolowano od ludzi. Wzrost tych drobnoustrojów może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych (8, 14, 17).

Gronkowce stanowią 65-90% fizjologicznej flory bakteryjnej kolonizującej skórę i błony śluzowe (głównie nosogardziel, pochwę i cewkę moczową) (14). Nawet 20-30% ludzi jest stałymi nosicielami gronkowca złocistego, natomiast przejściowe nosicielstwo dotyczy około 60% populacji. Szczególnie narażone na zwiększoną częstość występowania nosicielstwa są osoby chore na AIDS oraz na cukrzycę. Nosicielstwo obserwowane jest również u personelu medycznego, co jest istotne w szerzeniu wewnątrzszpitalnych zakażeń, szczególnie na oddziałach chirurgicznych, neonatologicznych i intensywnej terapii (8).

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* to stosunkowo często hodowane bakterie z próbek materiału klinicznego uzyskanego od pacjentów szpitalnych. Gronkowce mogą przeżyć w powietrzu kilka dni, przenosząc się i skażając środowisko szpitalne (2, 14). Ze względu na zdolność wytwarzania przez te bakterie biofilmu na urządzeniach medycznych oraz łatwość nabywania oporności na antybiotyki coraz większym problemem staje się leczenie infekcji gronkowcowych (22, 23). Amerykańskie Centrum Zapobiegania i Zwalczania Chorób (CDC) szacuje, że 65% zakażeń bakteryjnych związana jest właśnie z obecnością biofilmu (1). Ogólnoświatowy problem stanowi stale rosnąca liczba zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych, wywołana metycylinoopornymi szczepami *S. aureus* (10, 11). Coraz większe kliniczne znaczenie zaczynają również odgrywać zakażenia wywoływane przez szczepy koagulazo-ujemne, głównie *S. epidermidis* oraz *S. saprophyticus* (23). Bakterie te rozpowszechnione w środowisku szpitala łatwo nabywają oporności na antybiotyki stosowane w leczeniu chorych i mogą przekazywać geny oporności zjadliwym szczepom *S. aureus*.

Celem badań była analiza częstości występowania zakażeń gronkowcowych u pacjentów wieloprofilowego szpitala w Nowym Targu w latach 2001-2004 ze szczególnym zwróceniem uwagi na występowanie antybiotykooporności wśród izolowanych szczepów *S. aureus* i innych gronkowców opornych na metycylinę.

MATERIAŁ I METODY

W pracy wykorzystano wyniki badań przeprowadzonych w bakteriologicznym laboratorium szpitala i wykonanych na zlecenie lekarzy, pracowników poszczególnych oddziałów szpitala. Próbki materiału klinicznego do badań pobierane były przez fachowych pracowników szpitala, tj. lekarzy, pielęgniarki lub pracowników laboratorium bakteriologicznego według procedur opracowanych przez kierownika laboratorium i zatwierdzonych przez dyrektora szpitala. Badaniami objęto pacjentów leczonych w latach 2001-2004 na oddziałach: kardiologii, nefrologii, chirurgii, ortopedii, pediatrii, intensywnej terapii, ginekologii i oddziale noworodkowym.

Postępowanie z pobranym materiałem, a następnie hodowla na podłożach odbywały się w laboratorium zgodnie z procedurami opracowanymi w oparciu o ogólnodostępne publikacje (9, 12, 13, 24).

Do hodowli drobnoustrojów wykorzystywano gotowe podłoża firmy bioMerieux tj. podłoże agarowe z dodatkiem krwi oraz podłoże Chapmana. W diagnostyce gronkowców po posianiu próbki materiału klinicznego na podłoże agarowe z krwią i 16-godzinnej inkubacji brano pod uwagę wygląd kolonii oraz rodzaj hemolizy. Następnie po izolacji kolonii gronkowców i wykonaniu testów na obecność koagulazy i clumping factor przeprowadzono identyfikację zestawami ID32STAPH firmy bioMerieux. Hodowli bakterii z płynów ustrojowych dokonywano w aparacie BacT/ALERT firmy bioMerieux a dalszą diagnostykę przeprowadzano jak wyżej. Badanie wrażliwości bakterii na antybiotyki oraz badanie oporności na metycylinę wykonywano metodą krążkowo-dyfuzyjną na podłożu Mueller-Hintona firmy bioMerieux. Oznaczanie wrażliwości na antybiotyki wykonano zgodnie z zaleceniami zawartymi w publikacji (27).

W oparciu o zalecenia podane w rekomendacji (9, 27) dobierano zestaw antybiotyków i chemioterapeutyków oraz interpretowano wyniki badania oporności bakterii. Dla wankomycyny oznaczano MIC (ang Minimal Inhibitory Concentration) metodą dyfuzyjną z użyciem pasków E-test firmy bioMerieux zgodnie z procedurą opisaną przez producenta. Wyniki interpretowano zgodnie z wytycznymi podanymi w rekomendacji (9, 27).

WYNIKI

Analiza częstości izolacji drobnoustrojów z rodzaju *Staphylococcus* w 2001 roku wykazała, że spośród 377 izolatów, 105 uzyskano od pacjentów oddziału kardiologii, a 104 oddziału chirurgii. Najmniej szczepów gronkowców w 2001 roku izolowano na oddziale noworodkowym -12 oraz ginekologii -19. W 2002 roku drobnoustroje z rodzaju *Staphylococcus* wyhodowano od 620 pacjentów, z czego 116 od osób hospitalizowanych na oddziale chirurgii, 78 na oddziale kardiologii i 17 na oddziale ginekologii. W 2003 roku uzyskano łącznie 390 izolatów, najwięcej, bo 110 od pacjentów oddziału kardiologii, zaś najmniej, po 11 od pacjentów oddziałów noworodkowego i ginekologii. W 2004 roku gronkowce wyizolowano od 300 osób, z czego od 84 pacjentów oddziałów chirurgii i kardiologii i 4 od pacjentów oddziału ginekologii (Tabela I).

Bez względu na rok w którym przeprowadzono analizę oporności gronkowców na metycylinę, nie izolowano ich od pacjentów z oddziału noworodkowego i oddziału ginekologii, natomiast szczepy wrażliwe na metycylinę hodowano od pacjentów hospitalizowanych na wszystkich oddziałach (Tabela II).

Tabela I. Częstość izolowania szczepów z rodzaju *Staphylococcus* od pacjentów hospitalizowanych w poszczególnych oddziałach szpitalnych w latach 2001-2004.

Oddział/Rok	2001	2002	2003	2004	Razem
Kardiologii	105	78	110	84	377
Nefrologii	27	73	52	26	178
Chirurgii	104	116	87	84	391
Ortopedii	25	81	25	19	150
Pediatrii	20	31	31	24	106
Intensywnej opieki	31	80	26	10	147
Internistyczny	44	79	37	39	199
Noworodkowy	12	65	11	10	98
Ginekologii	19	17	11	4	51
Razem	387	620	390	300	1697

Tabela II. Częstość izolowania szczepów *S. aureus* od pacjentów hospitalizowanych w poszczególnych oddziałach szpitalnych w latach 2001-2004 z podziałem na szczepy metycylino-oporne (MR) i metycylino-wrażliwe (MS).

Oddział	Kardiologii	Nefrologii	Chirurgii	Ortopedii	Pediatrii	Intensywnej opieki	Internistyczny	Noworodkowy	Ginekologii
2001	St. aureus - MR	St. aureus - MR	St. aureus - MR	St. aureus - MR	St. aureus - MR	St. aureus - MR	St. aureus - MR	-	-
	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS
2002	-	-	St. aureus - MR	St. aureus - MR	-	St. aureus - MR	St. aureus - MR	-	-
	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS
2003	St. aureus - MR	St. aureus - MR	St. aureus - MR	-	-	St. aureus - MR	St. aureus - MR	-	-
	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS
2004	St. aureus - MR	-	St. aureus - MR	-	-	St. aureus - MR	St. aureus - MR	-	-
	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS	St. aureus - MS

W latach 2001-2004 stwierdzono wrażliwość wszystkich izolatów *Staphylococcus* sp. na wankomycynę i teikoplaninę. Wrażliwość na chloramfenikol, w zależności od roku, wahała się w granicach 87-93%. Szczepy *Staphylococcus* oporne na metycylinę wykazywały najniższą wrażliwość na tetracyklinę. W 2002 roku nie kontrolowano wrażliwości bakterii *Staphylococcus* na tetracyklinę i gentamycynę. W 2001 i 2002 roku częstość występowania gronkowca złocistego opornego na metycylinę była prawie czterokrotnie wyższa niż w latach 2003 i 2004 (Tabela III).

Tabela III. Antybiotykooporność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych w poszczególnych latach w szpitalu w Nowym Targu z podziałem na szczepy metycylino-oporne (MR) i metycylino-wrażliwe (MS).

Staphylococcus			Makrolid		Linkozamidy		Chemioterapeutyk				Tetracykliny				Aminoglikozyd		Amfenikole		Glikopeptydy			
			Erytromycyna		Klindamycyna		Biseptol		Chinolony		Doxycyklina		Tetracyklina		Gentamycyna		Chloramfenikol		Wankomycyna		Teikoplanina	
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
2001	Aureus MR	n	26	18	32	12	15	29	19	25	10	34	8	36	26	18	42	2	44	0	44	0
		%	59	41	73	27	34	66	43	57	23	77	18	82	59	41	95	5	100	0	100	0
	Aureus MS	n	139	18	143	14	149	8	122	35	105	52	99	58	117	40	152	5	157	0	157	0
		%	89	11	91	9	95	5	78	22	67	33	63	37	75	25	97	3	100	0	100	0
	Sp. MR	n	124	62	123	63	66	120	96	90	64	122	40	146	57	129	157	29	186	0	186	0
		%	67	33	66	34	36	64	52	48	35	65	22	78	31	69	85	15	100	0	100	0
	n	n	289	98	298	89	230	157	237	150	179	208	147	240	200	187	351	36	387	0	387	0
2002	Aureus MR	n	3	44	3	44	0	47	8	39	0	47	-	-	-	-	42	5	47	0	47	0
		%	6	94	6	94	0	100	17	83	0	100	-	-	-	-	90	10	100	0	100	0
	Aureus MS	n	224	23	224	23	192	55	193	54	221	26	-	-	-	-	193	54	247	0	247	0
		%	91	9	91	9	78	22	79	21	90	10	-	-	-	-	79	21	100	0	100	0
	Sp. MR	n	61	265	78	248	45	281	205	121	58	268	-	-	-	-	306	20	326	0	326	0
		%	19	81	24	76	14	86	63	37	18	82	-	-	-	-	94	6	100	0	100	0
	n	n	288	332	305	315	237	383	406	214	279	341					541	79	620	0	620	0
2003	Aureus MR	n	4	10	3	11	7	7	9	5	10	4	10	4	3	11	14	0	14	0	14	0
		%	29	71	22	78	50	50	65	35	71	29	71	29	22	78	100	0	100	0	100	0
	Aureus MS	n	151	17	159	9	150	18	135	33	118	50	116	52	151	17	136	32	168	0	168	0
		%	90	10	95	5	89	11	80	20	70	30	69	31	90	10	81	19	100	0	100	0
	Sp. MR	n	88	120	92	116	84	124	137	71	87	121	81	127	73	135	193	15	208	0	208	0
		%	43	57	44	56	40	60	66	34	42	58	39	61	35	65	93	7	100	0	100	0
	n	n	243	147	254	136	241	149	281	109	215	175	207	183	227	163	343	47	390	0	390	0
2004	Aureus MR	n	3	9	3	9	10	2	4	8	4	8	7	5	6	6	11	1	12	0	12	0
		%	25	75	25	75	83	17	33	67	33	67	58	42	50	50	92	8	100	0	100	0
	Aureus MS	n	71	60	120	11	122	9	95	36	48	83	62	69	108	23	127	4	131	0	131	0
		%	54	46	92	8	93	7	73	27	37	63	48	52	83	17	97	3	100	0	100	0
	Sp. MR	n	48	109	69	88	53	104	59	98	12	145	40	117	39	118	147	10	157	0	157	0
		%	31	69	44	56	34	66	38	62	8	92	26	74	25	75	94	6	100	0	100	0
	n	n	122	178	192	108	185	115	158	142	64	236	109	191	153	147	285	15	300	0	300	0
Razem	Aureus MR	n	36	81	41	76	32	85	40	77	24	93	25	45	35	35	109	8	117	0	117	0
		%	31	69	35	65	28	72	34	66	21	79	36	64	50	50	93	7	100	0	100	0
	Aureus MS	n	585	118	646	57	613	90	545	158	492	211	277	179	376	80	608	95	703	0	703	0
		%	83	17	92	8	88	12	78	22	70	30	61	39	83	17	87	13	100	0	100	0
	Sp. MR	n	321	556	362	515	248	629	497	380	221	656	161	390	169	382	803	74	877	0	877	0
		%	37	63	41	59	28	72	57	43	25	75	29	71	31	69	92	8	100	0	100	0

S- sensitive (wrażliwy), R- resistant (oporny) DYSKUSJA

DYSKUSJA

Biofilm bakteryjny to bakterie jednego lub wielu gatunków, zarówno bakterii chorobotwórczych jak i tworzących fizjologiczną florę bakteryjną organizmu, zanurzonych w glikopolisacharydowej otoczce, ułatwiającej przyleganie i pełniącej funkcję ochronną przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Bakterie żyjące w biofilmie są trwale złączone z podłożem, jednak w pewnych sytuacjach rozsiewają się po organizmie wywołując kolejne zakażenia (3, 6, 20, 25). W konsekwencji zwiększa się zjadliwość drobnoustroju, który staje się odporny na odpowiedź komórkową i humoralną organizmu, a nawet na duże dawki antybiotyków (4). Zdolność do wytwarzania biofilmu posiadają również bakterie probiotyczne, co może w przyszłości zostać wykorzystane w profilaktyce nosicielstwa i zakażeń bakteriami chorobotwórczymi (16). Istotnym elementem podczas kolonizacji bakterii chorobotwórczych odgrywa wytwarzanie śluzu, który umożliwia bakteriom tworzenie agregatów, ułatwiających przyleganie do różnych powierzchni (25). Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* wytwarzają biofilm, a dodatkowo mogą produkować koagulazę, powodującą przemianę fibrynogenu w fibrynę zwiększając przez to krzepliwość krwi człowieka (17, 18). Koagulazo-dodatnim gronkowcem jest *S. aureus,* który posiada również szereg innych czynników odpowiedzialnych za inwazyjność. Dodatkowo wirulencji sprzyja obecność białek, odpowiedzialnych za adhezję bakterii do tkanek organizmu w miejscu przerwania ich ciągłości (np. skóry, kości) lub do materiałów biomedycznych, a także liczne toksyny i enzymy wytwarzane przez gronkowca złocistego, które ułatwiają rozprzestrzenianie się bakterii po organizmie (8, 17).

Gronkowce złociste możemy podzielić na metycylino-wrażliwe (MS) i metycylino--oporne (MR). *S. aureus* oporny na metycylinę (MRSA) stanowi istotny problem zdrowia publicznego, ze względu na narastającą oporność, w tym oporność na leki tak zwanej ostatniej szansy, czyli na wankomycynę i linezolid (11). Należy pamiętać, że *S. aureus* jest przyczyną występowania zapalenia wsierdzia, zapalenia kości i stawów, ropni mózgu, infekcji dróg oddechowych czy groźnej dla życia posocznicy (15).

Przeprowadzone badania wykazały występowanie gronkowca złocistego wrażliwego na metycylinę (MS) u pacjentów hospitalizowanych w szpitalu w Nowym Targu we wszystkich analizowanych latach, na wszystkich oddziałach. Metycylino-oporny gronkowiec złocisty (MR) występował stale w czasie obserwacji na oddziale chirurgii, intensywnej terapii oraz na oddziale internistycznym, natomiast nie stwierdzano go w ogóle na oddziale noworodkowym i ginekologii. Wszystkie wyhodowane szczepy były w różnym odsetku wrażliwe na antybiotyki, ale wszystkie były wrażliwe na glikopeptydy, takie jak wankomycyna i teikoplanina. Trzeba mieć na uwadze, że częste występowanie gronkowców opornych na metycylinę zwiększa ryzyko wielolekooporności oraz podwyższa zagrożenie epidemiczne, szczególnie wśród pacjentów po zabiegach chirurgicznych i na oddziałach noworodkowych (10, 20).

Największy udział w zakażeniach z grupy koagulazo-ujemnych gronkowców mają *S. epidermidis, S. haemolyticus, S. hominis, S. warneri* i *S. caprae,* które mogą być zarówno metycylino-wrażliwe, jak i metycylino-oporne (5). Zarówno *S. epidermidis* jak i *S. saprophyticus* mają coraz większe znaczenie w wywoływaniu chorób u ludzi (23). *S. epidermidis* występuje powszechnie na błonach śluzowych, skórze i w jelicie grubym, *S. saprophyticus* stanowi fizjologiczną florę dróg moczowo-płciowych, zaś *S. haemolyticus* - florę fizjologiczną skóry i błon śluzowych. Bakterie te wywołują zakażenia oportunistyczne u osób z obniżo-

ną odpornością, np. w przebiegu chorób serca, chorób nowotworowych, u wcześniaków lub u osób z obecnym materiałem biomedycznym (np. z implantem, założonym cewnikiem lub rurką intubacyjną). *S. epidermidis* zajmuje trzecie, zaś *S. haemolyticus* drugie miejsce, wśród patogenów wywołujących zakażenia szpitalne, zarówno miejscowe jak i ogólnoustrojowe, mogąc być również czynnikiem etiologicznym sepsy. Bakterie te, pomimo zaliczenia ich do fizjologicznej flory człowieka, mogą powodować poważne komplikacje zdrowotne. Istnieje przypuszczenie, że okresowe nosicielstwo umożliwia kontakt komórek immunologicznych człowieka z bakteriami, co zapewnia skuteczniejszą odpowiedź komórkową w momencie zakażenia (7). *S. hominis* posiada zdolność wytwarzania biofilmu i jest przyczyną infekcji między innymi u osób posiadających stałe urządzenia protetyczne (21).

Badania próbek powietrza przeprowadzone w brazylijskim 500 łóżkowym szpitalu z oddziałami intensywnej terapii i przeszczepiania narządów wykazały, że w powietrzu najczęściej występowały szczepy *S. epidermidis* (25%) i *S. haemolyticus* (15,7%). Jednocześnie wykazano wysoką, sięgającą 66,7-70,6%, oporność tych bakterii na antybiotyki (2).

W badaniach własnych, pomimo wyhodowania bakterii opornych na metycylinę, nie stwierdzono oporności bakterii z rodzaju *Staphylococcus* na glikopeptydy. Najwyższą oporność gronkowców, sięgającą 71%, stwierdzono na tetracyklinę. W latach 2001-2004 stwierdzono wrażliwość gronkowców na chloramfenikol sięgającą 87-93%.

Ze względu na specyfikę szerzenia się zakażeń gronkowcami, wynikającą głównie z braku higieny rąk, WHO opracowało program mający na celu zapewnienie bezpieczeństwa pacjentom przebywającym w szpitalach. Program ten, opracowany przez zespół międzynarodowych ekspertów, obejmujący promowanie higieny rąk w placówkach opieki zdrowotnej został przyjęty w 2009 roku (26). Badania przeprowadzone w Brighton w Anglii na przełomie 2011 i 2012 roku wykazały jednak, że jedynie za 3,5% przypadków zakażeń *S. aureus* u pacjentów oddziału intensywnej opieki medycznej odpowiedzialna była transmisja zarazka od personelu medycznego (19). Ze względu na krótki okres obowiązywania zaleceń WHO, wskazane jest dalsze kontrolowanie częstości występowania zakażeń gronkowcami, we wszystkich placówkach medycznych.

PODSUMOWANIE

1. Najwyższą wrażliwość gronkowców izolowanych w latach 2001-2004 od pacjentów wieloprofilowego szpitala w Nowym Targu odnotowano na antybiotyki z grupy glikopeptydów, a najniższą na tetracykliny.
2. Najwięcej szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowano od pacjentów oddziału kardiologii, a najmniej oddziału ginekologii.
3. Wskazane jest monitorowanie częstości izolacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* po wprowadzeniu zaleceń WHO dotyczących higieny rąk na oddziałach szpitalnych.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M*. Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. Otolaryngol Head Neck Surg 2006, 134: 991 – 6.

2. *Botelho AM, Nunes ZD, Asensi MD* i inni. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from hospital indoor air and a comparative analysis between airborne and inpatient isolates of Staphylococcus epidermidis. J Med Microbiol 2012, 61: 1136–45.
3. *Costeron JW, Stewart PS, Greenberg EP*. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. Science 1999, 284: 1318–21.
4. *Davies D*. Understending biofilm resistence to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2003, 2, 2: 114–22.
5. *Götz F, Bannerman T, Schleifer KH*. The genera Staphylococcus and Micrococcus. W: The Prokaryotes. a Handbook on the biology of bacteria. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, Vol. 4 (Dworkin M, Falkow S., Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E. eds) Third edition. Springer Science+ Business Media LLC 2006, 5-75.
6. *Hoa M, Tomovic S, Nistico L* i inni. Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2009, 73, 9: 1242-8.
7. *Hoffmann LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ* i inni. Aminoglicoside antibiotics induces bacterial biofilm formation. Nature 2005, 436: 1171–5.
8. *Hryniewicz W*: Zakażenia wywołane przez ziarenkowce Gram-dodatnie. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze tom 2, rodział 42: Choroby wywołane przez bakterie. Cianciara J, Juszczyk J. Wydawnictwo Czelej 2012.
9. *Hryniewicz W, Sulikowska A, Szczypa K, Krzystoń-Russjan J, Gniadkowski M.* Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Wydawnictwo Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek Warszawa 2001.
10. *Kaczmarek A, Budzyńska A, Gospodarek E*: Porównanie wybranych metod identyfikacji meticylinoopornych szczepów Staphylococcus aureus. Med Dośw Mikrobiol 2009, 61: 207- 14.
11. *Kasprzyk J, Piechowicz L, Wiśniewska K* i inni. Differentiation of spa types and Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in medical sites of Gdańsk region. Med Dośw Mikrobiol 2015, 67: 79–88.
12. *Kędzia W, Koniar H.* Diagnostyka mikrobiologiczna. PZWL 1980.
13. *Krasemann Ch.* Pobieranie i transportowanie materiałów do badań bakteriologicznych. Med Prakt. Kraków 1995.
14. *Lenart-Boroń A, Wolny-Koładka K, Kwaśniewska A*. Isolation, identification and drug-resistance assessment of Staphylococci from the air of a University of Agriculture in Cracow dormitory. Pol J Agronomy 2014, 16: 19–23.
15. *Mandal S, Berendt AR, Peacock SJ*. Staphylococcus aureus bone and joint infection. J Infect. 2002, 44: 143–51.
16. *Olszewska-Sosińska O, Zielnik-Jurkiewicz B, Gajkowska B, Strzałkowski R*. Description of the bacterial flora and biofilms on the surface of the adenoids in children with chronic adenoiditis. Otolaryngol Pol 2011, 65, 3: 65-71.
17. *Peacock SJ, Lina G, Etienne J, Foster TJ*. Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi expresses a fibronectin-binding protein. Infect Immun. 1999, 67, 8: 4272-5.
18. *Pietruczuk-Padzik A, Stefańska J, Semczuk K* i inni. Evaluation of biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from sputum of cystic fibrosis patients. Med Dośw Mikrobiol 2010, 62: 1-8.
19. *Price JR, Cole K, Bexley A* i inni. Modernising Medical Microbiology informatics group. Transmission of Staphylococcus aureus between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. Lancet Infect Dis 2017, 2: 207-14.

20. *Szczuka E, Prawda-Zołotar J, Nowakiewicz M, Kaznowski A*. Wrażliwość na antybiotyki i zdolność wytwarzania śluzu przez szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych. Med Dośw Mikrobiol 2011, 63: 15–27.
21. *Szczuka E, Trawczyński K, Kaznowski A*. Clonal Analysis of Staphylococcus hominis Strains Isolated from Hospitalized Patients. Pol J Microbiol 2014, 63, 3: 349–54.
22. *Walencka E, Sadowska B, Więckowska-Szakiel M, Różalska B*. Aktywność indolicydyny, osobno lub w połączeniu z oksacyliną, wobec *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Med Dośw Mikrobiol 2008, 60: 191–6.
23. *Warren R*: Staphylococcus aureus - A cross sectional study of prevalence and risk factors in one general practice. Aust Fam Physician 2012, 41: 325-8.
24. *Gabriel V.* Mikrobiologia i choroby zakaźne. Elsevier Urban and Partner Wrocław 2000.
25. *Wróblewska J, Ciok–Pater E, Sękowska A, Gospodarek E*. Comparison of three methods detection of slime production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Med Dośw Mikrobiol 2010, 62: 303–8.
26. Wytyczne WHO dotyczące higieny rąk w opiece zdrowotnej – podsumowanie. WHO 2009.
27. *Żabicka D, Hryniewicz W.* Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2010, Oznaczanie wrażliwości ziarniaków gram dodatnich z rodzaju Staphylococcus spp. Wydawnictwo Krajowy Ośrodek Referencyjny sds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. Warszawa 2010.

Otrzymano: 15 III 2017 r.
Adres Autora: 43-300 Bielsko-Biała, ul. Willowa 2, Wydział Nauk o Zdrowiu, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej
e-mail: wwaksmanska@ath.bielsko.pl

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 15 - 25

Molekularna charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zakażeń miejsca operowanego u pacjentów południowej Polski

Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical site infections of patients in southern Poland

Monika Pomorska-Wesołowska[1], Katarzyna Małyszek[2], Dorota Romaniszyn[3], Monika Pobiega[3], Anna Szczypta[4], Mirosława Dzikowska[5], Agnieszka Chmielarczyk[3], Anna Różańska[3], Joanna Maciąg[6], Jadwiga Wójkowska-Mach[3]

[1]Korlab s.c. NZOZ. Rudzkie Laboratorium Analityczno-Bakteriologiczne, Ruda Śląska
[2]Arcana Institute Ltd, Kraków
[3]Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
[4]Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, Akademia Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Kraków
[5]Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
[6]Instytut Stomatologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Celem pracy była analiza lekooporności oraz molekularna charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z zakażeń miejsca operowanego pacjentów 12 szpitali południowej Polski. Częstość występowania szczepów MRSA wynosiła ogółem 17,9% i była najniższa na oddziałach ortopedii – 8,7%, a najwyższa na oddziałach chirurgii naczyń – 42,9%. Najwyższą, około 25% lekooporność badanych szczepów stwierdzono w odniesieniu do erytromycyny, klindamycyny i ciprofloksacyny. Typowanie *spa* wykazało 10 typów, z dominacją t003 oraz t138.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, zakażenia miejsca operowanego, Polska, MRSA

ABSTRACT

Introduction: The aim of the study was a molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from surgical site infections (SSIs) from patients in southern Poland, undergoing different surgical procedures, together with evaluation of the prevalence of antimicrobial resistance and the presence of virulence factors.

Materials and Methods: In this laboratory-based, multicentre study, non-repetitive 162 samples from SSI were collected from hospitalised patients (12 hospitals, n=139) or outpatients (n=23) in southern Poland between January 1 and December 31, 2013. In all *S.aureus* isolates, we investigated antimicrobial susceptibility, the presence of selected virulence genes (*lukE*, *pvl*, *tsst-1* and *eta*), and also conducted *spa* typing.

Results: Patients with SSI had a median age of 61 years; 54.9% were male. Prevalence of MRSA (29 strains, 17.9%) SSI per surgery type was 8.7% in orthopaedic, 17.7% in general and 42.9% in vascular surgery. Over 20% of strains were resistant for erythromycin (27.2%), clindamycin (23.5%) and ciprofloxacin (23.5%). No resistance was found for linezolid, glycopeptides or tigecycline. Gene of leukocidin (*luk*E) was the most frequently found gene. *Spa* typing identified 10 *spa* types; the two dominant types were t003 (41.4%) and t138 (17.2%).
Conclusions: The results show that after vascular surgery, there was an unexpectedly high prevalence of MRSA in SSIs in southern Poland. Conversely, the prevalence of MRSA was unexpectedly low following orthopaedics procedures. The surprisingly observation was the low virulence of the *S. aureus* strains among older patients.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, surgical site infections, Poland, MRSA

WSTĘP

Staphylococcus aureus pozostaje jednym z najczęściej izolowanych etiologicznych czynników zakażeń miejsca operowanego (ZMO). Przykładowo, w USA jest trzecim w kolejności najczęściej izolowanym drobnoustrojem (10). Wedle danych European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) dotyczących nadzoru nad ZMO u pacjentów operowanych w Europie *S. aureus* był odpowiedzialny za 17,4% przypadków ZMO, a jego udział wynosił od 4,5% na oddziałach chirurgii jelita cienkiego, do 40% na oddziałach ortopedycznych (7). Jednym z elementów warunkujących tak duży udział *S. aureus* w wywoływaniu ZMO jest wytwarzanie przez ten drobnoustrój wielu różnych czynników zjadliwości (4, 19, 6, 28).

Celem obecnego badania było określenie częstości występowania szczepów MRSA u pacjentów południowej Polski poddawanych różnego typu zabiegom operacyjnym oraz molekularna analiza tych szczepów, ze szczególnym uwzględnieniem występowania u nich genów kodujących wybrane czynniki zjadliwości i lekooporności.

MATERIAŁ I METODY

Pochodzenie szczepów bakteryjnych. Szczepy były izolowane w trakcie realizacji rutynowego postępowania diagnostycznego w Katedrze Mikrobiologii CMUJ w Krakowie oraz w Korlab s.c. NZOZ Rudzkie Laboratorium Analityczno-Bakteriologiczne. Szczepy pozyskiwano od pacjentów z obszaru południowej Polski (Małopolska i Śląsk). Szczegółowej analizie poddawano tylko pierwsze izolacje uzyskane w okresie od 1.01.2013 do 31.12.2013 od 162 pacjentów z objawami ZMO, rozpoznawanymi zgodnie z definicjami ZMO wg. ECDC, w terminie do 30 dni od operacji – bądź 1 roku w przypadkach stosowania implantów. Pacjenci byli leczeni w ramach opieki szpitalnej (12 szpitali, 139 szczepów) albo ambulatoryjnej (23 szczepy). Ogółem uzyskano 162 szczepy *S. aureus*, w tym 29 szczepów MRSA. Wyniki badania niektórych szczepów (n=23) zostały opisane we wcześniejszej publikacji, której celem była analiza profilu epidemiologicznego *S. aureus* w różnych klinicznych zakażeniach, w tym skóry i tkanek miękkich (w tym

innych niż ZMO) (3). W niniejszej pracy określano wiek i płeć pacjentów z ZMO oraz typ zabiegu operacyjnego, któremu byli poddawani: chirurgia ogólna, naczyniowa, ortopedia i inne. W żadnym ze szpitali/oddziałów nie realizowano rutynowego nadzoru nad MRSA obejmującego badania przesiewowe oraz eradykację. Wszystkie szczepy przechowywano w temperaturze -70°C.

Badanie lekowrażliwości szczepów. Badanie lekowrażliwości 162 szczepów *S. aureus* realizowano zgodnie z zaleceniami European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. W metodzie dyfuzyjno-krążkowej wykorzystano następujące krążki (Oxoid, Basingstoke, UK): cefoksytyna (FOX, 30 µg), klindamycyna (DA, 2 µg), erytromycyna (E, 15 µg), ciprofloksacyna (CIP, 5 µg), moksyfloksacyna (MXF, 5 µg), gentamycyna (CN, 10 µg), amikacyna (AK, 30 µg), tobramycyna (TOB, 10 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1.25/23.75 µg), mupirocyna (MUP, 200 µg) oraz linezolid (LZD, 10 µg) (8). W odniesieniu do wankomycyny (VAN), teikoplaniny (TEC) oraz tygecykliny (TGC) określano najmniejsze stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów (ang. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) z wykorzystaniem E-testów (bioMèrieux, Paris, France). Fenotyp oporności MLSB badano metodą dwóch krążków, z krążkiem z erytromycyną umieszczonym w pobliżu krążka z klindamycyną.

Izolacja DNA. Badane szczepy bakteryjne hodowano w bulionie tryptozowo-sojowym w 37°C przez noc, a następnie izolowano genomowe DNA z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) zgodnie z instrukcją producenta.

Detekcja genów oporności i wirulencji z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). U wszystkich badanych izolatów (n=162) poszukiwano obecności genów oporności. Metodę PCR wykorzystano do amplifikacji genu *mec*A (154 par zasad, pz) z zastosowaniem opisanych wcześniej starterów (20). Jako dodatniej kontroli używano szczepu *S. aureus* ATCC 33591 (*mec*A+), a jako ujemnej kontroli szczepu S. *aureus* ATCC 25923 (*mec*A−). Metoda PCR była także zastosowana do wykrywania genu oporności na mupirocynę – *mup*A (458 pz) (1). W tym przypadku dodatnią kontrolę stanowił szczep *S. aureus* ATCC BAA-1708 (*mupA*+). Geny oporności na erytromycynę (*erm*A -645 pz, *erm*B -639 pz, *erm*C – 642 pz, i *msr*- 399 pz) były wykrywane metodą multipleks PCR, a w przypadku uzyskania dodatnich wyników, przy użyciu pojedynczych reakcji PCR, z poszczególnymi starterami (133). W prowadzonych badaniach poszukiwano najczęściej wykrywanych genów oporności związanych z występującymi mechanizmami oporności: MRSA (*mec*A) oraz MLSB (*msr*, *erm*A, *erm*B, *erm*C). Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze 0,5xTBE (70 min, 90V) i wizualizowano w transiluminatorze UVP GelDocIT Imaging System (UVP, Upland, Canada). W elektroforezie stosowano marker wielkości 100-1000 pz (ThermoScientifics, Waltham, MA, USA). Izolaty *S. aureus* były także badane pod kątem obecności wybranych genów wirulencji z wykorzystaniem metody PCR z opisanymi wcześniej starterami: *lukE* (leukocydyna lukE 269 pz), *pvl* (leukocydyna Panton-Valentine, PVL 433 pz), *tsst-1* (toksyna zespołu wstrząsu toksycznego, TSST 559 pz) oraz *eta* i *etb* (eksfoliatyna A i B, 119 pz i 200pz) (11, 13, 14). Jako dodatnich kontroli użyto szczepów *S. aureus* o numerach 2535/07 (*eta*+, *etb*+, *luk*E+), 6616/09 (*tsst*1+, *pvl*+) użyczonych przez Prof. Marka Gniadkowskiego z Narodowego Instytutu Leków z Warszawy.

Genotypowanie *spa* oraz RFLP-PFGE. Wszystkie izolaty MRSA (n=29) poddano typowaniu *spa*. Wykonano sekwencjonowanie genu *spa* kodującego polimorficzny region X białka A *S. aureus*. W tym celu, przy użyciu metody PCR, amplifikowano gen *spa*, a produkty amplifikacji rozdzielano elektroforezą w 1,5% żelu agarozowym (31, 5). Produkty PCR sekwencjonowano w zewnętrznym laboratorium (Genomed, Warsaw, Poland). Sekwencje nukleotydowe amplikonów były analizowane w celu określenia różnych typów *spa* dla poszczególnych izolatów z wykorzystaniem strony internetowej Ridom, prowadzonej przez Ridom GmbH (Münster, Germany) (24).

Wszystkie izolaty MRSA (n=29) poddano genotypowaniu z wykorzystaniem metody RFLP-PFGE (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism by Pulsed-Field Gel Electrophoresis) według opublikowanego wcześniej protokołu z drobnymi modyfikacjami, używając aparatu CHEF-DR III (Bio-Rad) (17). Program GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) był wykorzystany do przeprowadzenia analizy podobieństwa, stosowano współczynnik Dice i metodę średniego wiązania (UPGMA, ang. the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Na dendrogramie podobieństwa (Ryc. 1) zaznaczono izolaty o identycznych pulsotypach (zaliczono je do jednego klonu), jako wzorca używano szczepu *S. aureus* ATCC 11632.

Analiza statystyczna. Dane nominalne porównywano stosując test Fisher'a, wykorzystano Statistica 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Istotność statystyczną przyjęto na poziomie 0,05.

Komisja Bioetyczna. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET/227/B/2012).

WYNIKI

Badane przypadki ZMO i lekooporność *S.aureus*. Mediana wieku pacjentów wyniosła 61 lat, mężczyźni stanowili 54,9% badanych. Szczepy MRSA (n=29 ogółem) były istotnie częściej izolowane od starszych pacjentów (67 vs. 60 lata, p=0,005) oraz od pacjentów po zabiegach w zakresie chirurgii naczyniowej, gdzie ryzyko MRSA było czterokrotnie wyższe niż MSSA (20,7% vs. 6,0%, OR 4,08 95% CI 1,293–12,849, p=0.02).

Najczęstszy profil oporności dotyczył 90 szczepów (55,6%), które nie wykazały oporności na żaden z badanych antybiotyków, natomiast 7 szczepów (4,3%) wykazało oporność na każdy z antybiotyków poza linezolidem, glikopeptydami i tygecykliną – na te antybiotyki wszystkie przebadane szczepy pozostawały wrażliwe. Najwyższą lekooporność badane szczepy wykazywały wobec makrolidów (erytromycyna), linkozamidów oraz fluorochinolonów. Częstość występowania MRSA wyniosła ogółem 17,9%. Dokładna analiza wykazała jednak znaczące różnice w zależności od oddziału szpitalnego, na którym byli hospitalizowani pacjenci. I tak, na oddziałach ortopedii częstość ta wynosiła 8,7%, na oddziałach chirurgii ogólnej 17,7% a na oddziałach chirurgii naczyń 42,9% . Znacząco wyższy udział szczepów lekoopornych na różne grupy antybiotyków stwierdzono w przypadku konstytutywnego fenotypu cMLSB niż indukcyjnego fenotypu iMLSB (p=0.00156), ale ryzyko oporności MLSB nie miało związku z typem operacji. Szczepy MRSA były w znacznie większym stopniu oporne na antybiotyki, dotyczyło to szczególnie lekooporności na 5 albo więcej grup antybiotyków (Tabela 2). Wartość MIC_{50}/MIC_{90}

wankomycyny i teikoplaniny dla szczepów MRSA wynosiła 1/1,5 mg/ml natomiast tygecykliny: 0.064/0.125 mg/ml. Gronkowce o fenotypie MLSB przejawiały wyższe wartości MIC glikopeptydów (VAN/TEC), (p=0,002) (obserwacja ta nie dotyczyła MIC tygecykliny). Obecność genu oporności na mupirocynę stwierdzono u jednego szczepu MSSA, ale badanie fenotypowe tego szczepu nie wykazało oporności.

Tabela 1 Charakterystyka pacjentów z objawami zakażenia miejsca operowanego o etiologii *Staphylococcus aureus*

Charakterystyka badanej grupy		ogółem (n=162)	MRSA (n=29)	MSSA (n=133)	OR (95%CI)	p-value	prewalencja MRSA (%)
Wiek (lata) (mediana, kwartyle: Q1;Q3)		61 (48;69)	67 (58;80	60 (48;68)	N/A	0,0048	N/A
Płeć	kobiety (n;%)	73 (45,1)	11 (37,9)	62 (46,6)	1,34 (0,596-3,022)	0,39434	14,7
	mężczyźni (n;%)	89 (54,9)	18 (62,1)	71 (53,4)			20,2
Typ zabiegu operacyjnego	ogólna (n;%)	113 (69,8)	20 (69,0)	93 (69,9)	0,96 (0,401-2,281)	0,90354	17,7
	ortopedia (n;%)	23 (14,2)	2 (6,9)	21 (15,8)	0,36 (0,079-1,630)	0,17233	8,7
	naczyniowa (n;%)	14 (8,6)	6 (20,7)	8 (6,0)	4,08 (1,293-12,849)	0,02098	42,9
	inne (n;%)	12 (7,4)	1 (3,5)	11 (8,3)	0,39 (0,049-3,196)	0,32889	8,3
	ogółem	162 (100)	29 (100)	133 (100)	N/A	0,157	17,9

MRSA metycylinooporny *Staphylococcus aureus*, MSSA metycylinowrażliwy *Staphylococcus aureus*; OR (95%CI) 95% przedział ufności odds ratio; N/A nie dotyczy

Czynniki zjadliwości i genotypowanie. U badanych izolatów najczęściej stwierdzano obecność genu kodującego leukocydynę *luk*E (Tabela 3). Udział *tsst-1* był istotnie wyższy u szczepów izolowanych od pacjentów oddziałów chirurgii ogólnej (51,7% vs 26,3, OR=2,61; 95% CI: 1,146–5,959; p=0,05). Najmniejszą liczbę badanych czynników stwierdzono u szczepów pochodzących od pacjentów z ZMO z oddziałów ortopedycznych (27,6% vs. 88,7%, OR=0,33; 95% CI 0,126–0,885; p=0,03). Gen kodujący eksfoliatynę *eta* stwierdzono u istotnie młodszych pacjentów (mediana wieku (Q1;Q3): 34 (31;55) vs. 61 (50;70), p=0,0009). Liczba czynników zjadliwości, a zatem i stopień zjadliwości nie miał związku z fenotypem MRSA czy MLSB.

Analiza profili restrykcyjnych izolatów MRSA po cięciu enzymem *Sma*I w typowaniu PFGE nie ujawniła jednego dominującego klonu epidemicznego: 29 izolatów wykazywało 27 różnych pulsotypów, większość z nich charakteryzowała się podobieństwem na poziomie poniżej 70%-80%, co sugeruje genetycznie różnorodną populację. Znaleziono dwie pary szczepów o identycznych pulsotypach, pochodziły one z różnych szpitali. Typowanie s*pa* wykazało 10 różnych typów *spa*, dominowały dwa główne typy: t003 (41.4%) i t138 (17.2%). Spośród trzech szczepów MRSA posiadających gen *pvl* dwa należały do typu t138, a jeden do t003. Wszystkie pulsotypy, typy *spa* oraz geny wirulencji dla szczepów MRSA są przedstawione na Rycinie 1.

Tabela 2. Lekooporność *Staphylococcus aureus* wg. fenotypu: MSSA vs. MRSA

Kategoria antybiotyków	Lek przeciw/drobnoustrojowy	ogółem (n=162)	MRSA (n=29)	MSSA (n=133)	OR (95%CI)	p-value
aminoglikozydy	gentamycyna	21 (13,0)	11 (38,0)	10 (8,0)	7,52 (2,6- 20,208)	<0,0004
	amikacyna	37 (22,8)	21 (72,0)	16 (12,0)	19,19 (7,295-50,51)	<0,0001
	tobramycyna	34 (21,0)	23 (79,0)	11 (8,0)	42,52 (14,295-126,447)	<0,0001
fluorochinolony	ciprofloksacyna	38 (23,5)	26 (90,0)	12 (9,0)	87,39 (23,015-331,822)	<0,0001
	moksyfloksacyna	31 (19,1)	24 (83,0)	7 (5,0)	86,4 (25,308-294,967)	<0,0001
linkozamidy	klindamycyna	38 (23,5)	22 (76,0)	16 (12,0)	22,982 (8,470-62,358)	<0,0001
makrolidy	erytromycyna	44 (27,2)	22 (76,0)	22 (17,0)	15,86 (6,037-41,652)	<0,0001
glikopeptydy	wankomycyna	0	0	0	N/A	N/A
	teikoplanina	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A	N/A
glicylocykliny	tygecyklina	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A	N/A
oksazolidony	linezolid	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	N/A	N/A
inne	mupirocyna	1 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.8)	N/A	0.67311
	trimetoprim/sulfametoksazol	16 (9.9)	8 (28.0)	8 (6.0)	5.95 (2.014-17.590)	<0.00145
MLSB, tak (n;%)		40 (75.3)	21 (72.4)	19 (14.3)	15.75 (6.102-40.650)	<0.0001

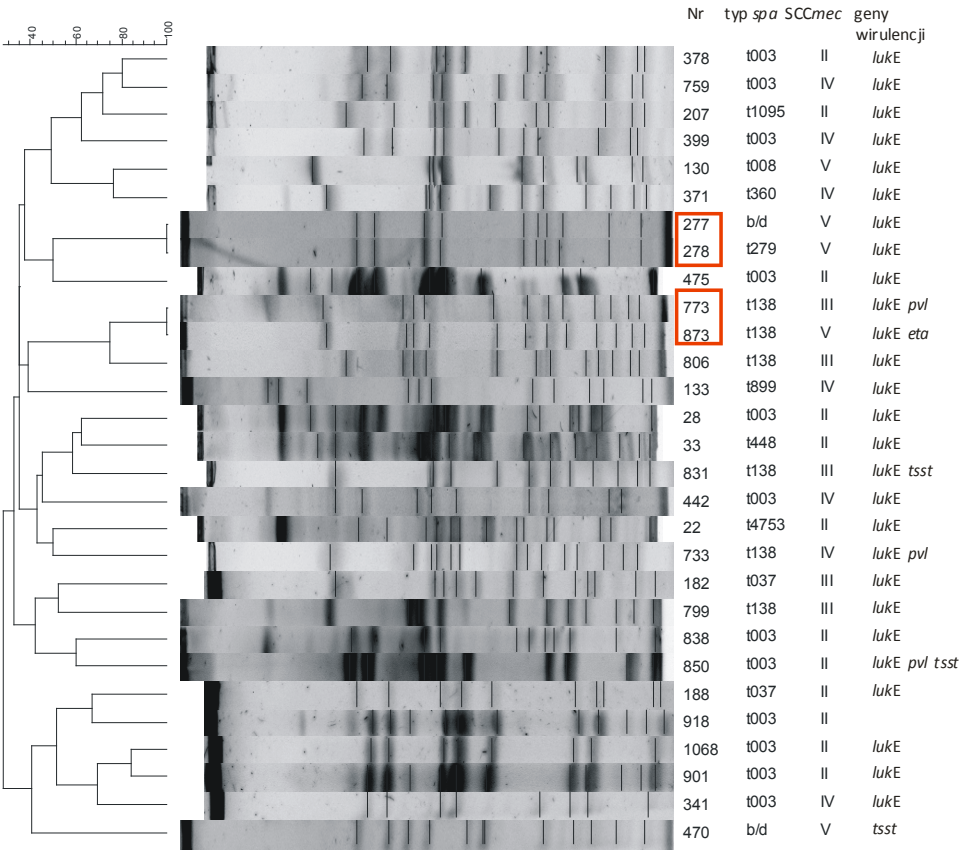
MRSA metycylinooporny *Staphylococcus aureus*, MSSA metycylinowrażliwy *Staphylococcus aureus*; OR (95%CI) 95% przedział ufności odds ratio;
N/A nie dotyczy

Tabela 3. Obecność genów warunkujący czynnik zjadliwości wg fenotypu: MSSA vs. MRSA

Gen warunkujący czynnik zjadliwości, tak	ogółem (n=162)	MRSA (n=29)	MSSA (n=133)	OR (95%CI)	p-value
*luk*E (n;%)	145 (89,5)	27 (93)	118 (89)	1,72 (0,370-7,953)	0,37902
tsst-1 (n;%)	29 (17,9)	4 (14)	25 (19)	0,69 (0,221-2,165)	0,71168
pvl (n;%)	9 (5,8)	3 (10)	6 (5)	2,44 (0,574-10,399)	0,20345
eta (n;%)	10 (6,2)	1 (3)	6 (5)	0,76 (0,088-6,531)	0,43595
Liczba znalezionych genów [n;%]					
0 (n;%)	10 (6,2)	1 (3)	9 (7)	0,49 (0,059-4,044)	0,646
1 (n;%)	114 (70,4)	22 (76)	92 (69)	1,40 (0,554-3,538)	
2 (n;%)	35 (21,6)	5 (17)	30 (23)	0,72 (0,251-2,036)	
3 (n;%)	3 (1,9)	1 (3)	2 (2)	2,34 (0,205-26,703)	

*luk*E *Luk*DE leukocydyny, *pvl* leukocydyna Panton-Valentina, *tsst-1* toksyna toxic shock syndrome toxin-1, *eta* eksfoliatyna A, OR (95%CI) 95% przedział ufności odds ratio; N/A nie dotyczy

Rycina 1. Dendrogram podobieństwa izolatów MRSA genotypowanych przy użyciu metody PFGE wraz z typami *spa* i genami wirulencji. Ramkami oznaczono szczepy o identycznych pulsotypach.



DYSKUSJA

Prezentowane dane są wynikami pierwszych wieloośrodkowych badań poświęconych mikrobiologii ZMO w Polsce. Dotychczas dostępne dane dotyczące zakażeń uogólnionych z roku 2013 wskazują na udział MRSA na poziomie 16% oraz ponad 15% ich udział w różnych formach klinicznych zakażeń w szpitalach wieloprofilowych, co było nieco niższym poziomem niż średnia europejska (3, 7). W badaniach *Łuczak-Kadłubowskiej* i wsp. (15) MRSA w zakażeniach miejsca operowanego w Polsce, występowały z częstością 22,7%. Podobnie wyniki uzyskano w badaniu *Matyni* i wsp. (16), w którym dodatkowo analizowano częstość występowania szczepów MRSA w zależności od województwa – w woj. małopolskim MRSA stanowił 20,5% izolatów *S. aureus*, w woj. śląskim 16,1%. W pracach tych nie podawano typów zabiegów operacyjnych, po których stwierdzano ZMO, co zgodnie z prezentowanymi danymi ma istotne znaczenie w epidemiologii MRSA.

Wcześniejsze jednoośrodkowe badania autorów wykazały ryzyko MRSA po zabiegach kardiochirurgicznych i ortopedycznych na poziomie porównywalnym do danych ogólnoeuropejskich ECDC (35, 36), podczas gdy w bieżącej analizie udział MRSA zna-

cząco różnił się w zależności od typu oddziału i był niższy od opisywanego przez ECDC (7). Szczególnie zwraca uwagę niska częstość występowania MRSA u pacjentów po zabiegach ortpedycznych, przy braku w badanych szpitalach rutynowego nadzoru nad MRSA.

Przeprowadzone badania wykazały, że analizowane przez nas szczepy rzadko posiadały geny kodujące poszczególne geny zjadliwości, co wskazuje na potencjalnie ich niską zjadliwość. Gen kodujący *tsst-1* był obecny w większej części szczepów niż *pvl* (17,9% szczepów vs. 5,5%). Wysoki udział *tsst-1* raportował również Rijnders (25) na podstawie badań *S. aureus* holenderskich oddziałów intensywnej terapii (21%). Jednak prezentowane dane odbiegają od obserwacji *Schmitza* (30), który wskazywał na wyższy udział *tsst-1* u szczepów fenotypu MRSA (MSSA 8% vs. MRSA 16%). W badaniach *Chini* i wsp. (2) stwierdzono wyższą niż w niniejszej pracy częstość występowania genu *pvl* (14% szczepów vs. 5,8%), a udział lekoopornych szczepów z genem *pvl* był nawet znacznie wyższy (4,6% MSSA vs. 23% MRSA) niż w prezentowanych danych w tej pracy (5,0% MSSA vs. 10,0% MRSA) – jednak tendencja pozostała taka sama. Prezentowane wyniki nie wskazują na powiązanie pomiędzy genami wirulencji, szczególnie *pvl* z konkretnym typem *spa*.

W niniejszym badaniu wykazano odwrotną zależność pomiędzy wiekiem pacjentów, a obecnością u badanych szczepów genów kodujących eksfoliatynę. Wynika z tego, że nie można wykluczyć ryzyka rozwoju zakażeń ZMO u starszych pacjentów szczepami nie posiadającymi pełnej zjadliwości.

Wielolekooporność szczepów ze ZMO wyniosła w badanej populacji 17,9%, ale co ważne, szczepy MRSA statystycznie istotnie częściej były oporne również na wiele innych grup leków. Spostrzeżenie to potwierdza wyniki uzyskane przez innych autorów (2, 16, 29). Obserwowana w naszych badaniach częstość występowania szczepów MRSA jest wysoka, chociaż pojedyncze doniesienia z Polski, jak i z innych krajów, zwłaszcza rozwijających się, wykazują jeszcze wyższy, sięgający 30-90%, udział MRSA wśród izolatów *S. aureus* (12, 21, 35, 27). Niniejsza analiza potwierdza niestety szczególne narażenie na MRSA pacjentów starszych, co znajduje również potwierdzenie we wcześniejszej wynikach uzyskanych przez autorów, pokazujących korelację pomiędzy wiekiem pacjentów a częstością izolacji szczepów MRSA jak i opornością tych szczepów na antybiotyki inne niż beta-laktamy, zwłaszcza trimetoprim z sulfametoksazolem (23).

Uzyskane w naszych badaniach wartości MIC odpowiadają danym uzyskanym przez *Takesue* (34), a brak wcześniejszych danych z Polski uniemożliwia ocenę dynamiki zmian w wartościach MIC.

Liczne wcześniejsze doniesienia wskazywały na możliwy, odwrotnie proporcjonalny, związek pomiędzy lekoopornością szczepów a ich zjadliwością (29, 18). Zarówno jednak niniejsze dane, jak i wcześniejsze prace autorów nie potwierdzają istnienia podobnego związku w badanych szczepach pochodzących z przypadków zakażeń u pacjentów południowej Polski (22, 27).

W prezentowanej pracy, podobnie jak w doniesieniach *Perl'a* (21), stwierdzono występowanie oporności badanych szczepów na mupirocynę na niskim poziomie. Jednak co ważne, brak wrażliwości nie został wykryty metodą dyfuzyjno-krążkową, co wskazuje na konieczność realizacji badań przesiewowych dla oznaczenia oporności na mupirocynę technikami PCR.

Wynik typowania *spa* szczepów MRSA wykazał dominację typu t003 (ponad 40%), należącego do kompleksu klonalnego CC5. Podobny typ *spa* dominował w badaniach prowadzonych przez *Ilczyszyn* i wsp. (9) właśnie w grupie szczepów MRSA pomimo, że badane szczepy izolowane były z zakażeń inwazyjnych całkiem innej grupy pacjentów - dzieci

i noworodków. Drugim znaczącym w naszych badaniach typem *spa* był t138 związany w literaturze z kompleksem klonalnym CC8 (32)

Wynik typowania izolatów metodą RFLP-PFGE pokazuje duże genetyczne zróżnicowanie szczepów MRSA pochodzących od pacjentów ze ZMO, co sugeruje, że nie pochodzą one z jednego źródła. Nie zidentyfikowano żadnego klonu epidemicznego, co świadczy o braku transmisji horyzontalnej. Oznacza to, że kolonizacja szczepami MRSA dokonywała się u badanych pacjentów w środowisku pozaszpitalnym. Dotyczyło to przede wszystkim pacjentów chirurgii naczyniowej, gdzie istnieje duże ryzyko konieczności hospitalizacji i operacji pacjentów z ranami przewlekłymi. Zatem w tej grupie pacjentów nadzór nad zakażeniami MRSA powinien obejmować również badania przesiewowe próbek materiału z ran oraz stosowaniem odpowiednich leków, np. oktenidyny (26). Potwierdzają to dane opisujące różnorodność szczepów MRSA izolowanych w szpitalach Polski południowej nie tylko z zakażeń miejsca operowanego ale również innych form klinicznych zakażeń, mających podstawowe znaczenie w epidemiologii zakażeń w szpitalach (3).

Podsumowując należy stwierdzić, że uzyskane wyniki wskazują na konieczność stosowania u pacjentów z przewlekłymi ranami profilaktyki zakażeń o etiologii MRSA uwzględniającego stosowanie również przedoperacyjnej eradykacji MRSA z ran przewlekłych.

Badanie było finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki: DEC-2011/03/B/NZ7/01911.

PIŚMIENNICTWO

1. *Anthony RM, Connor AM, Power EG* i inni. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 30-4.
2. *Chini V, Petinaki E, Foka A* i inni. Spread of *Staphylococcus aureus clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece.* Clin Microbiol Infect 2006; 12: 29-34.
3. *Chmielarczyk A, Pomorska-Wesołowska M, Szczypta A* i inni. Molecular analysis of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from different types of infections from patients hospitalized in 12 regional, non-teaching hospitals in southern Poland. J Hosp Infect 2016, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2016.10.024
4. *Grimes J, Carpenter C, Reinker K*. Toxic shock syndrome as a complication of orthopaedic surgery. J Pediatr Orthop 1995; 15: 666-71.
5. *Harmsen D, Claus H, Witte W* i inni. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol 2003; 41: 5442-8.
6. *Holmes A, Ganner M, McGuane S* i inni. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J Clin Microbiol 2005; 43: 2384-90.
7. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx (access 9.08.2016)
8. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf (access 9.04.2015)

9. *Ilczyszyn WM, Sabat AJ, Akkerboom V* i inni. Clonal Structure and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Invasive Infections in Paediatric Patients from South Poland: Association between Age, spa Types, Clonal Complexes, and Genetic Markers. PLoS One 2016; 11: e0151937.
10. *Jarnigan J*. Is the burden of *Staphylococcus aureus* among patients with surgical-site infections growing? Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 457-60.
11. *Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP* i inni. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 426-30.
12. *Leski TA, Gniadkowski M, Skoczyńska A* i inni.:Outbreak of mupirocin-resistant staphylococci in a hospital in Warsaw, Poland, due to plasmid transmission and clonal spread of several strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 2781-8.
13. *Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F* i inni. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32.
14. *Løvseth A, Loncarevic S, Berdal KG*. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. J Clin Microbiol 2004; 42: 3869-72.
15. *Łuczak-Kadłubowska A, Sulikowska A, Empel J* i inni. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. J Clin Microbiol 2008; 46: 2930-7.
16. *Matynia B, Młodzinska E, Hryniewicz W*. Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* in Poland obtained by the National Quality Assurance Programme. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 379-85.
17. *McDougal LK, Steward CD, Killgore GE* i inni. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clinical Microbiology 2003; 41: 5113-20.
18. *Melzer M, Eykyn J, Gransden R, Chinn S*. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* More Virulent than Methicilillin-Susceptible *S. aureus*? A Comparative Cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and Bacteremia. Clin Infec Dis 2003; 37: 1456-60.
19. *Morinaga N, Kaihou Y, Noda M*. Purification, cloning and characterization of variant LukE--LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. Microbiol Immunol 2003; 47: 81-90.
20. *Pereira EM, Schuenck RP, Malvar KL* i inni. *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus:* methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. Microbiol Res 2010; 165: 243-9.
21. *Perl TM, Cullen JJ, Wenzel R* i inni. Intranasal mupirocin to prevent postoperative Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med 2002; 346: 1871-7.
22. *Pobiega M, Myjak I, Pomorska-Wesołowska M* i inni. Virulence Potential of *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated From Diabetic Foot Ulcers Among Patients From Southern Poland. Curr Vasc Pharmacol. 2016 Jun 24.
23. *Pomorska-Wesołowska M, Różańska A, Natkaniec J* i inni. Longevity and gender as the risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in southern Poland. BMC Geriatr. 2017;10;17(1):51. doi: 10.1186/s12877-017-0442-3.
24. RidomSpaServer, available from http://www.spaserver.ridom.de/ (access 9.04.2015).
25. *Rijnders MI, Deurenberg RH, Boumans ML* i inni. Antibiotic Resistance Surveillance Group, Stobberingh EE: Population structure of *Staphylococcus aureus strains isolated from intensive care unit patients in the Netherlands over an 11-year period (1996 to 2006)*. J Clin Microbiol 2009; 47: 4090-5.
26. *Rohr U, Mueller C, Wilhelm M* i inni. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* whole-body decolonization among hospitalized patients with variable site colonization by using mupirocin in combination with octenidinedi hydrochloride J Hosp Infect 2003; 54: 305-9.

27. *Romaniszyn D, Różańska A, Wójkowska-Mach J* i inni. Epidemiology, antibiotic consumption and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* infections – data from the Polish Neonatology Surveillance Network, 2009-2012. BMC Infect Dis 2015; 15: 169.
28. *Ruzickova V, Voller J, Pantucek R* i inni. Multiplex PCR for detection of three exfoliative toxin serotype genes in Staphylococcus aureus. Folia Microbiol (Praha) 2005; 50: 499-502.
29. *Sapri HF, Sani NAM, Neoh H, Hussin S*. Epidemiological Study on *Staphylococcus aureus* Isolates Reveals Inverse Relationship between Antibiotic Resistance and Virulence Repertoire. Indian J Microbiol 2013; 53: 321-2.
30. *Schmitz FJ, MacKenzie CR, Geisel R* i inni. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains. Eur J Epidemiol 1997; 13: 699-708.
31. *Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO* i inni. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 3556-63.
32. *Shore AC, Brennan OM, Deasy EC* i inni. DNA microarray profiling of a diverse collection of nosocomial methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates assigns the majority to the correct sequence type and staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type and results in the subsequent identification and characterization of novel SCCmec-SCCM1 composite islands. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 5340-55.
33. *Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A* i inni. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2562-6.
34. *Takesue Y, Watanabe A, Hanaki H* i inni. Nationwide surveillance of antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from surgical site infections (SSI) in Japan. J Infect Chemother 2012; 18: 816-26.
35. *Wójkowska-Mach J, Baran M, Synowiec E* i inni. Surgical site infections following cardiac surgery supervision-own experience. Przegląd Lekarski, 2008; 65: 335-9.
36. *Wójkowska-Mach J, Jaje E, Romaniszyn D* i inni. Comparison of SSI rate in endoarthoplasty of hip and knee in a Cracow patient population and the importance of post discharge surveillance. Infection 2008; 36: 36-40.

Otrzymano: 21 XI 2016 r.
Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysta 18, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 27 - 34

Ocena przydatności opracowanego we własnym zakresie lateksowego testu aglutynacyjnego do poszukiwania przeciwciał dla antygenów pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* u osób z jersiniozą

Development and evaluation of a latex agglutination test for the detection of antibodies to *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in humans with yersiniosis

Waldemar Rastawicki, Anna Chróst, Kornelia Gielarowiec

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
Zakład Bakteriologii, Warszawa

Oceniono przydatność opracowanego we własnym zakresie lateksowego testu aglutynacyjnego do poszukiwania przeciwciał dla antygenów pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* w surowicy osób z jersiniozą. Wchodzący w skład zestawu odczynnik z zawiesiną pałeczek *Yersinia* zapewnia wysoką czułość (97,0%), natomiast odczynnik z zawiesiną białek wydzielniczych Yop wysoką swoistość (96,4%) testu w stosunku do odczynu ELISA. Opracowany test lateksowy, charakteryzujący się prostotą i szybkością wykonania może być przydatny we wstępnej, różnicującej serodiagnostyce jersiniozy.

Słowa kluczowe: *Yersinia*, jersinioza, serodiagnostyka, przeciwciała, lateks, ELISA

ABSTRACT

Introduction: The laboratory serodiagnosis of yersiniosis is based mainly on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western-blot. The assays are sensitive and specific but are expensive, laborious and requires enzyme-conjugated secondary antibodies against immunoglobulin of respective animal species. In the present study, we developed the latex agglutination test (LAT) for the rapid detection of antibodies against *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* and evaluated this test by comparing it with in-house ELISA with LPS and Yop proteins of *Yersinia* as antigens.

Materials and Methods: A total number of 160 sera obtained from patients with yersiniosis or suspected in clinical investigations for this disease were tested. In order to assess potential cross-reactivity, 160 sera of humans without known history of yersiniosis were tested by LAT, including 80 sera of healthy persons and 80 sera from a control group of

patients with diagnosed other than *Yersinia* bacterial infection (*Salmonella*, *Campylobacter*, VTEC, *F. tularensis*). The LAT was composed of control reagent (latex coated with bovine serum albumin) and two diagnostic reagents (first, coated with mixture of suspensions of *Y. enterocolitica* serotype O3, O8 and *Y. pseudotuberculosis* I and second, coated with released Yop proteins). Latex reagents were mixed for 10 minutes with the same volume (25 µl) of sera diluted in PBS from 1:2 to 1:128 on a glass plate.
Results: Comparison between the results of in-house ELISA and LAT coated with mixture of *Yersinia* suspensions showed the 97.0% sensitivity and 74.7% specificity and between in-house ELISA and LAT coated with Yop proteins the 74,8% sensitivity and 96.4% specificity of the developed rapid latex assay. The incidence of positive results of LAT among patients with other than *Yersinia* bacterial infection was much lower than among patients with yersiniosis and similar to results obtained with group of healthy persons. In the present study there was no positive reaction with control latex reagent.
Conclusions: The latex agglutination test developed in our laboratory may be used as a kit composed of control reagent and two diagnostic reagents in routine, screening serodiagnosis of yersiniosis. It is a fast, easy-to-perform and cost-efficient tool for the detection of antibodies to *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. However, in the case of sera negative by LAT coated with Yop proteins, the positive results of LAT coated with *Yersinia* suspensions must be confirmed by ELISA or western-blot.

Key words: *Yersinia*, yersiniosis, serodiagnosis, antibodies, latex, ELISA

WSTĘP

W serodiagnostyce jersiniozy do poszukiwania swoistych przeciwciał dla pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* znalazło zastosowanie szereg odczynów serologicznych, z których obecnie najczęściej używa się testu ELISA i testu western-immunoblotting (1, 4, 8). W odczynach tych stosuje się jako antygeny wydzielnicze białka Yop jak również preparaty lipopolisacharydów, uzyskanych z pałeczek należących do różnych grup serologicznych (8). Ze względu na to, że odczyny te są kosztowne i pracochłonne oraz muszą być wykonywane w odpowiednio wyposażonych laboratoriach mikrobiologicznych, zachodzi potrzeba opracowania taniego i prostego w wykonaniu testu, możliwego do przeprowadzenia w ciągu zaledwie kilku minut w każdym laboratorium diagnostycznym. Mając to na uwadze, podjęto próbę opracowania we własnym zakresie testu aglutynacyjnego, w którym wykorzystano cząsteczki lateksu opłaszczone zawiesiną pałeczek *Yersinia* należących do różnych serotypów oraz zawiesiną wydzielniczych białek Yop. W prezentowanej pracy oceniono przydatność takiego testu do poszukiwania przeciwciał dla antygenów pałeczek *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* u osób z jersiniozą.

MATERIAŁ I METODY

1. Odczyn lateksowy (OL). Aglutynacyjny odczyn lateksowy wykonywano przy użyciu odczynników (kontrolnego i diagnostycznego) przygotowanych we własnym zakresie. Odczynnik kontrolny stanowiła zawiesina polistyrenowego lateksu opłaszczonego albuminą bydlęcą. Do poszukiwania swoistych przeciwciał użyto dwóch lateksowych odczynników

diagnostycznych: jednego, opłaszczonego zawiesiną pałeczek *Yersinia* oraz drugiego, opłaszczonego wydzielniczymi białkami Yop, wysoce swoistymi dla patogennych pałeczek *Yersinia*.

1.1. Odczynnik diagnostyczny z zawiesiną pałeczek *Yersinia* sp. Szczepy *Y. enterocolitica* bioserotypu O3/4, *Y. enterocolitica* bioserotypu O8/1B oraz *Y. pseudotuberculosis* I namnażano w podłożu BHI w objętości po 220 ml w temp. 25°C przez 24 godziny, a następnie przez 5 godzin wytrząsano w łaźni wodnej w temp. 37°C. Uzyskane hodowle bakteryjne wirowano przy obrotach 10 x tys. przez 20 minut, osad jednokrotnie płukano zbuforowanym roztworem 0,85% NaCl (PBS) i zawieszano w 15 ml PBS. Zawiesiny inkubowano we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut, a następnie zamrażano w temperaturze -20° C. Przed opłaszczaniem na lateksie, zawiesinę rozmrażano, rozbijano ultradźwiękami przez 2 minuty i wirowano przy obrotach 14 x tys. przez 20 minut. Do opłaszczenia 9 ml lateksu w rozcieńczeniu użytkowym dodawano 9 ml supernatantu uzyskanego po wirowaniu zawiesiny bakteryjnej (po 3 ml z każdej hodowli bakteryjnej). Uzyskaną mieszaninę inkubowano przy wytrząsaniu przez 2 godziny w łaźni wodnej w temperaturze 37°C, dwukrotnie płukano buforem glicynowym i wirowano przy obrotach 8 x tys. przez 15 minut. Uzyskany osad zawieszano w 7 ml buforu glicynowego z dodatkiem azydku sodu a następnie w 7 ml buforu glicynowego z dodatkiem azydku sodu i albuminy bydlęcej.

1.2. Odczynnik diagnostyczny z wydzielniczymi białkami Yop. Wydzielnicze białka Yop pałeczek *Yersinia* uzyskano zgodnie z procedurą opisaną uprzednio (2, 6). Zawiesinę białek w objętości 2 ml worteksowano, zawieszano w 7 ml buforu glicynowego, a następnie homogenizowano ultradźwiękami przez 30 sekund. Do opłaszczenia 9 ml lateksu w rozcieńczeniu użytkowym dodawano 9 ml uzyskanej w ten sposób homogennej zawiesiny białek i postępowano dalej tak jak w przypadku lateksu opłaszczonego zawiesiną bakteryjną.

1.3. Odczynnik kontrolny. Odczynnik kontrolny uzyskiwano analogicznie jak odczynnik diagnostyczny z tym, że zamiast antygenów pałeczek *Yersinia* na lateksie opłaszczano albuminę bydlęcą.

1.4. Prowadzenie oznaczeń testem lateksowym. Na wydzielone pola płytki z czarnego szkła nanoszono równolegle w trzech szeregach po 25 µl próbki surowicy w kolejnych, dwukrotnych rozcieńczeniach (od rozcieńczenia 1/2 do rozcieńczenia 1/128), a następnie po 25 µl diagnostycznego odczynnika lateksowego z zawiesiną pałeczek *Yersinia* i z zawiesiną wydzielniczych białek Yop oraz odczynnika kontrolnego. Po wymieszaniu reagentów plastikowym pręcikiem płytki kołysano na trzęsawce przez 10 minut. Intensywność reakcji zlepnej oceniano przez lupę o powiększeniu 5x według 6 stopniowej skali (od 0 do 5). Za diagnostycznie znamienną przyjmowano reakcję o intensywności ocenianej na 3 lub więcej punktów przy rozcieńczeniu próbki surowicy 1/2 lub wyższym oraz przy jednoczesnym braku reakcji z kontrolnym odczynnikiem lateksowym.

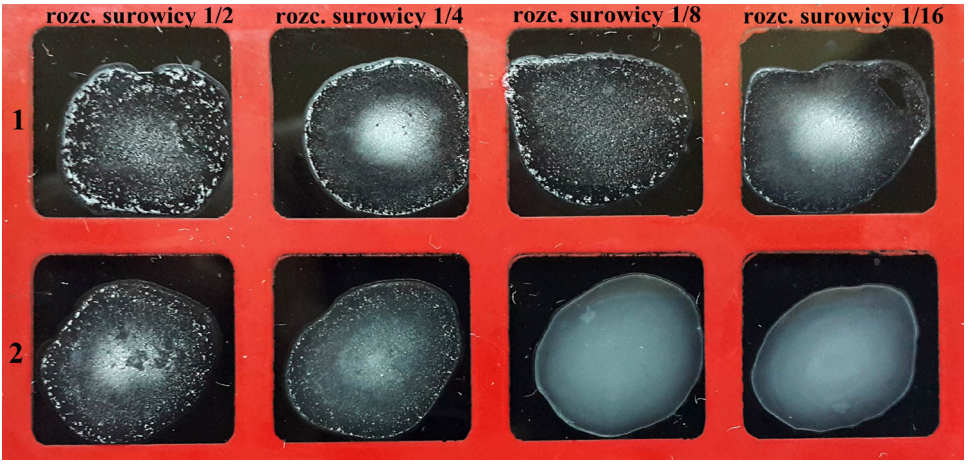
2. Odczyn ELISA. Odczyn wykonywano na płytkach polistyrenowych firmy Nunc zgodnie z metodyką podaną uprzednio z uwzględnieniem niezbędnych modyfikacji (6, 8). Poziom przeciwciał oznaczano w klasie immunoglobulin A, G i M w próbkach surowicy rozcieńczonych 1/100. W badaniach posłużono się króliczymi immunoglobulinami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA, IgG, IgM -HRP, firmy Dako, Denmark). Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali światła 450 nm. W odczynie ELISA jako antygeny zastosowano lipopolisacharydy pałeczek *Y. enterocolitica* serotypu O3, O8, O9, *Y. pseudotuberculosis* I, wydzielnicze (natywne) białka Yop oraz rekombinowane białko YopD, uzyskane zgodnie z metodyką podaną uprzednio (6, 7, 8).

3. Próbki surowicy. Do badań przeznaczono ogółem 320 próbek surowicy, w tym:

- 80 próbek uzyskanych od osób podejrzanych o jersiniozę, z dodatnim wynikiem badania serologicznego w odczynie ELISA z jersiniozą. Do badań przeznaczono próbki jednoznacznie określone jako dodatnie, tzn. w uprzednio przeprowadzonych badaniach odczynem ELISA wykryto u nich podwyższony poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM zarówno dla antygenów LPS jak i wydzielniczych białek Yop pałeczek Yersinia
- 80 próbek uzyskanych od osób podejrzanych o jersiniozę, z ujemnym wynikiem badania serologicznego odczynem ELISA w tym kierunku
- 80 próbek uzyskanych od osób klinicznie zdrowych (od 40 zdrowych dzieci oraz 40 krwiodawców).
- 80 próbek uzyskanych od osób z grupy kontrolnej, z wysokim poziomem przeciwciał dla antygenów pałeczek *Salmonella*, *Campylobacter*, werotoksycznych *E. coli* lub *F. tularensis*. Próbki te posłużyły do określenia swoistości opracowanego testu lateksowego.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I przedstawiono wyniki oznaczeń testem lateksowym poziomu przeciwciał w próbkach surowicy uzyskanych od wszystkich 320 osób. Nie stwierdzono występowania nieswoistych wyników dodatnich przy użyciu lateksowego odczynnika kontrolnego. W przypadku badania 80 próbek surowicy osób z jersiniozą potwierdzoną odczynem ELISA, aż w 77 (96,3%) uzyskano testem lateksowym z zawiesiną bakteryjną wynik dodatni, tzn. stwierdzono aglutynację ocenioną co najmniej na 3 w rozcieńczeniu surowicy 1/2 lub wyższym. Znacznie niższą czułość uzyskano podczas badania tych próbek testem lateksowym z wydzielniczymi białkami Yop (66,3%). Typowy obraz aglutynacji w opracowanym odczynie lateksowym przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Wynik aglutynacji w odczynie lateksowym zawiesiny pałeczek *Yersinia* sp. (1) oraz zawiesiny białek wydzielniczych Yop (2) z próbką surowicy osoby z jersiniozą.

Tabela I. Występowanie i poziom przeciwciał określonych odczynem lateksowym z zawiesiną pałeczek *Yersinia* sp. oraz odczynem lateksowym z białkami wydzielniczymi Yop w próbkach surowicy uzyskanych od osób podejrzanych w badaniu klinicznym o jersiniozę, osób klinicznie zdrowych oraz osób z grupy kontrolnej.

Grupa badanych osób	Liczba	Lateks	Liczba (odsetek) próbek surowicy z wynikiem dodatnim:						
			N	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Osoby podejrzane o jersiniozę, z dodatnim wynikiem badania serologicznego w odczynie ELISA	80	Zaw.	3 (3,8%)	8 (10,0%)	22 (27,5%)	19 (23,8%)	16 (20,0%)	7 (8,8%)	5 (6,3%)
		Yop	27 (33,8)	14 (17,5%)	11 (13,8%)	6 (7,5%)	11 (13,8%)	6 (7,5%)	5 (6,3%)
Osoby podejrzane o jersiniozę, z ujemnym wynikiem badania serologicznego w odczynie ELISA	80	Zaw.	59 (73,8%)	15 (18,8%)	6 (7,5%)	-	-	-	-
		Yop	77 (96,2%)	3 (3,8%)	-	-	-	-	-
Osoby klinicznie zdrowe (krwiodawcy + zdrowe dzieci)	80	Zaw.	60 (75,0%)	8 (10,0%)	9 (11,3%)	3 (3,8%)	-	-	-
		Yop	77 (96,3%)	3 (3,8%)	-	-	-	-	-
Osoby z grupy kontrolnej, z wysokim poziomem przeciwciał dla różnych antygenów bakteryjnych	0	Zaw.	53 (66,3%)	10 (12,5%)	8 (10,0%)	7 (8,8%)	2 (2,5%)	-	-
		Yop	77 (96,2%)	3 (3,8%)	-	-	-	-	-

Podczas badania próbek surowicy uzyskanych od osób z pozostałych trzech grup odsetek wyników dodatnich był podobny i wynosił od 25,0% do 33,8% w przypadku użycia testu lateksowego z zawiesiną bakteryjną oraz 3,8% w przypadku testu z zawiesiną białek Yop. W próbkach surowicy osób z tych trzech grup kontrolnych nie wykrywano testem lateksowym z białkami Yop przeciwciał w mianie wyższym niż 2.

W tabeli II porównano częstość wykrywania przeciwciał odczynem ELISA oraz odczynem lateksowym w próbkach surowicy osób podejrzanych w badaniu klinicznym o jersiniozę. Na uwagę zasługuje fakt, że w przypadku badania 21 próbek surowicy ujemnych w odczynie ELISA uzyskano wynik dodatni w odczynie lateksowym z zawiesiną pałeczek *Yersinia*. Z drugiej strony, badając 27 próbek surowicy dodatnich w odczynie ELISA nie uzyskano reakcji dodatnich odczynem lateksowym z białkami Yop. Takie wyniki wskazują na wysoką czułość odczynu lateksowego z zawiesiną pałeczek *Yersinia* (97,0%) oraz wysoką swoistość odczynu lateksowego z białkami Yop (96,4%) w stosunku do referencyjnego odczynu ELISA.

Tabela II. Porównanie częstości wykrywania przeciwciał odczynem ELISA oraz odczynem lateksowym (OL) z zawiesiną pałeczek *Yersinia* sp. i odczynem lateksowym z białkami wydzielniczymi Yop w 160 próbkach surowicy uzyskanych od osób podejrzanych w badaniu klinicznym o jersiniozę.

Odczyn lateksowy (OL)	Liczba (odsetek) próbek z wynikiem:				Czułość OL w stosunku do ELISA	Swoistość OL w stosunku do ELISA
	ELISA+ LATEKS+	ELISA+ LATEKS–	ELISA – LATEKS+	ELISA– LATEKS–		
Lateks z zawiesiną pałeczek *Yersinia* sp.	77	3	21	59	97,0%	74,7%
Lateks z białkami wydzielniczymi Yop	53	27	3	77	74,8%	96,4%

Duża liczba dodatnich wyników uzyskanych w teście lateksowym z zawiesiną pałeczek *Yersinia* wiąże się z niską swoistością zastosowanego antygenu (74,7%). Mając jednak na uwadze fakt, że z założenia opracowany test miał być odczynem przeglądowym, w którym wymagana jest jak najwyższa czułość, niska swoistość nie musi go dyskwalifikować. Z tego punktu widzenia bardziej niepokojąca jest niska czułość (74,8%) testu lateksowego z białkami Yop w stosunku do odczynu ELISA. Jest to o tyle interesujące, że jak wynika ze szczegółowej analizy, poziom przeciwciał oznaczany w teście lateksowym nie jest ściśle skorelowany z poziomem przeciwciał wykrywanym w odczynie ELISA. O ile w przypadku trzech próbek surowicy sklasyfikowanych jako ujemne w odczynie ELISA a dodatnie w teście lateksowym z białkami Yop (wszystkie reagowały wyłącznie przy najmniejszym rozcieńczeniu 1/2) przeciwciała klasy IgM były wykrywane odczynem ELISA na poziomie wątpliwym, to w przypadku próbek surowicy jednoznacznie dodatnich w odczynie ELISA mieliśmy do czynienia zarówno z wynikami ujemnymi jak i wysoce dodatnimi w odczynie lateksowym. W tabeli III przedstawiono średni poziom przeciwciał wykrywanych testem lateksowym z białkami Yop oraz testem ELISA z antygenem białek natywnych Yop oraz rekombinowanym białkiem YopD w wybranych próbkach surowicy. Jak widać, różne surowice o bardzo podobnym poziomie przeciwciał klasy IgM (prawie identyczne średnie wartości), a więc immunoglobulin odpowiedzialnych za reakcję aglutynacji, reagowały czasami bardzo silnie w teście lateksowym z białkami Yop (miana często powyżej 32) jak też nie wykazywały żadnych reakcji w tym odczynie. Należy jednak nadmienić, że surowice te reagowały zazwyczaj dość silnie z testem lateksowym z zawiesiną bakteryjną.

Tabela III. Porównanie średniego poziomu przeciwciał wykrywanego odczynem ELISA z antygenem białek wydzielniczych Yop oraz rekombinowanym białkiem YopD w wybranych próbkach surowicy o różnym poziomie miana przeciwciał w odczynie lateksowym (OL).

Wynik w ELISA / OL	L	Średnia wartość miana przeciwciał w OL	Średni poziom przeciwciał w ELISA z antygenem białek wydzielniczych Yop			Średni poziom przeciwciał w ELISA z rekombinowanym białkiem YopD		
			IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
ELISA + LATEKS +	6	45,3	34,4	16,2	30,0	36,9	17,8	24,6
ELISA + LATEKS -	13	0	24,2	14,5	29,0	22,6	16,1	26,8

W prezentowanej pracy, na etapie ustalania parametrów testu lateksowego, opracowano pierwotnie osobne odczynniki diagnostyczne z zawiesiną pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu O3/4, O8/1B i *Y. pseudotuberculosis* I. Przeprowadzona wstępna analiza wyników badań próbek surowicy osób zakażonych pałeczkami *Yersinia* należącymi do różnych grup serologicznych nie wykazała jednak istotnych różnic w obrazie odpowiedzi humoralnej, badanej przy zastosowaniu tych odczynników i lateksu opłaszczonego mieszaniną różnych pałeczek *Yersinia*. Taki obraz odpowiedzi humoralnej związany jest z podobieństwem budowy antygenowej pałeczek *Yersinia* należących do różnych grup serologicznych czy nawet gatunków. Uwaga ta dotyczy przede wszystkim pałeczek *Y. enterocolitica* należących do grup serologicznych O3 i O9 (8). Tak więc, z powodu występowania trudnych do wyeliminowania reakcji krzyżowych, jak również dla maksymalnego uproszczenia testu, w dalszej części badań zastosowano odczynnik diagnostyczny będący lateksem opłaszczonym mieszaniną pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu O3/4, O8/1B i *Y. pseudotuberculosis* I. Pałeczki *Y. enterocolitica* bioserotypu O8/1B użyto do opłaszczania lateksu ze względu na występowanie w Polsce od szeregu lat zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje (9). Tak opracowany odczynnik lateksowy wykazywał wyraźne reakcje dodatnie nie tylko z próbkami surowicy o wysokim poziomie przeciwciał dla LPS wszystkich trzech zastosowanych serotypów pałeczek *Yersinia,* ale również z próbkami surowicy o wysokim poziomie przeciwciał dla LPS pałeczek *Y. enterocolitica* serotypu O9.

Z dostępnego przeglądu piśmiennictwa wynika, że jak dotychczas tylko sporadycznie podejmowano próbę opracowania szybkiego, lateksowego testu przydatnego zarówno do identyfikacji O antygenów pałeczek *Yersinia* izolowanych z próbek materiału klinicznego jak i do poszukiwania swoistych przeciwciał w surowicy (3, 5, 10). Co więcej, komercyjnie nie są dostępne także inne szybkie i proste testy przydatne w serodiagnostyce jersiniozy. Opracowany przez nas test lateksowy, charakteryzujący się prostotą i szybkością wykonania, można stosować we wstępnej, różnicującej serodiagnostyce jersiniozy, zwłaszcza wtedy, kiedy mamy do czynienia z próbkami surowicy uzyskanymi w początkowym okresie choroby, z wysokim poziomem przeciwciał klasy IgM. W skład takiego zestawu diagnostycznego powinien wchodzić zarówno odczynnik z zawiesiną pałeczek *Yersinia* (wysoka czułość zestawu) jak i odczynnik z białkami wydzielniczymi Yop (wysoka swoistość zestawu). Uzyskanie wyniku dodatniego z obydwoma odczynnikami lateksowymi (zwłaszcza w mianie wyższym niż 2) świadczyłoby jednoznacznie o obecności w badanej próbce swoistych przeciwciał. Uzyskanie wyniku ujemnego przy rozcieńczeniu surowicy 1/2 z obydwoma odczynnikami przemawiałoby o braku tych przeciwciał na diagnostycznie znamiennym poziomie. W przypadku uzyskania wyniku dodatniego przy zastosowaniu odczynnika lateksowego opłaszczonego zawiesiną bakteryjną i wyniku ujemnego przy użyciu odczynnika opłaszczonego białkami Yop, próbkę surowicy należałoby zbadać odczynem ELISA, bądź też testem western-immunoblotting.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bottone EJ*. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes Infect 1999; 1: 323-3.
2. *Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R*. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. Grown in calcium-deficient media. Infect Immun 1986; 54: 561-7.

3. *Jagielski M, Kochman M, Szych J* i inni. Ocena przydatności odczynu lateksowego do wykrywania i identyfikacji O antygenów pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*. Med Dośw Mikrobiol 1996, 48: 31-7.
4. *Kapperud G, Slome SB*. *Yersinia enterocolitica* infections, W: Bacterial infections of humans, red. Evans AS, Brachman PS. (Third Edition). Plenum Medical Book Company, New York and London, 1998, str. 859-73.
5. *Mikhaĭlov LM, Titenko AM, Rudnik MP, Zakhlebnaia OD*. The use of monoclonal antibodies for detecting the common antigenic determinants of *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O:9. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2000; 3: 63-6.
6. *Rastawicki W, Jagielski M, Gierczyński R*. Wykorzystanie wydzielniczych białek Yop paleczek *Yersinia* w serologicznej diagnostyce jersiniozą. I. Antygen do odczynu immunoenzymatycznego. Med Dośw Mikrobiol 2003; 55: 125-33.
7. *Rastawicki W, Gierczyński R, Jagielski M*. Wykorzystanie wydzielniczych białek Yop pałeczek *Yersinia* w serologicznej diagnostyce jersiniozy. II. Zastosowanie metody rekombinacji genetycznej do uzyskania białka YopD. Med Dośw Mikrobiol 2004; 56: 41-7.
8. *Rastawicki W*. Humoralna odpowiedź na wybrane antygeny pałeczek *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* w przebiegu jersiniozą u ludzi. Praca habilitacyjna, PZH, Warszawa 2006.
9. *Rastawicki W, Szych J, Gierczyński R, Rokosz N*. A dramatic increase of *Yersinia enterocoliti*ca serogroup O:8 infections in Poland. Eur J Clin Microbiol Inf Dis 2009; 28: 535-7.
10. *Shpiliuk GF, Goloveshkina TN, Volodina IK* i inni. Latex immunoglobulin preparations for the rapid diagnosis of yersiniosis. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1993; 6: 92-3.

Otrzymano: 10 I 2017 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 35 - 41

Trudności w diagnostyce pełzakowatego ropnia wątrobowego

Diagnostic difficulties in amebic liver abscess

Jacek Czepiel[1,2], Martyna Gomulska[3], Grażyna Biesiada[1,2], Iwona Sobczyk-Krupiarz[1,2], Roksana Kisiel[4], Aleksander Garlicki[1,2]

[1]Klinika Chorób Zakaźnych i Tropikalnych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
[2]Oddział Kliniczny Chorób Zakaźnych Szpital Uniwersytecki w Krakowie
[3]Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Chorób Zakaźnych i Tropikalnych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
[4] Oddział Kliniczny Kliniki Kardiologii i Elektrokardiologii Interwencyjnej oraz Nadciśnienia Tętniczego, Szpital Uniwersytecki w Krakowie.

Pełzakowica jest chorobą pasożytniczą, wywołaną przez infekcję specyficznym dla człowieka pierwotniakiem *Entamoeba histolytica (E. histolytica)*. W niniejszej pracy przedstawiono trudności diagnostyczne u pacjentów wracających z rejonów endemicznych pełzakowicy, diagnozowanych w kierunku amebowego ropnia wątroby.

Słowa kluczowe: *ALA, diagnostyka, pełzakowica, pełzakowy ropień wątrobowy*

ABSTRACT

Amebiasis is a widespread parasitic infection caused by the human-specific protozoan *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). Tropical and subtropical regions with poor socioeconomic and sanitary conditions belong to endemic areas. The highest rates of *E. histolytica* infection are observed in India, Mexico, Africa, some parts of Central and South America. Up to 90% of infections remain asymptomatic, about 10% of patients develop amebic colitis. About 10% of symptomatic individuals may present with an extraintestinal manifestation, mostly amebic liver abscess (ALA). Clinical symptoms of ALA appear within 5 months after an exposition to *E. histolytica* cysts. Anamnesis revealing a travel to endemic area plays a crucial role in a diagnostic process, which is further supported by an physical examination, radiological findings, serology and parasitology test. The following article presents the difficulties which may occur when the ALA is suspected in a patient traveling from endemic areas.

Key words: ALA, diagnostics, amebiasis, amebic liver abscess

WSTĘP

Pełzakowica jest chorobą pasożytniczą, wywołaną przez infekcję specyficznym dla człowieka pierwotniakiem *Entamoeba histolytica (E. histolytica)*. Zarażenie to występuje na całym świecie, ze szczególnym nasileniem częstości w krajach strefy tropikalnej i subtropikalnej. Do zarażenia dochodzi na drodze transmisji fekalno-oralnej, poprzez zanieczyszczoną cystami *E. histolytica* wodę lub żywność. Do zarażeń dochodzi głównie w krajach rozwijających się, o niskich socjalno-ekonomicznych i sanitarnych warunkach. Regionami szczególnie niebezpiecznymi dla podróżnych są Indie, Afryka, Meksyk i niektóre regiony Środkowej i Południowej Ameryki. W krajach Europy i Ameryki Północnej chorują głównie pacjenci wracający z rejonów endemicznych (3,9,16,17). Do zakażenia może też dojść na drodze seksualnych kontaktów, zwłaszcza w grupie homoseksualnych mężczyzn. Podczas gdy homoseksualiści w USA i Europie bywają skolonizowani głównie *Entamoeba dispar (E. dispar)*, to przykładowo w Japonii i Tajwanie przeważa w tej grupie kolonizacja *E. histolytica* (5,14).

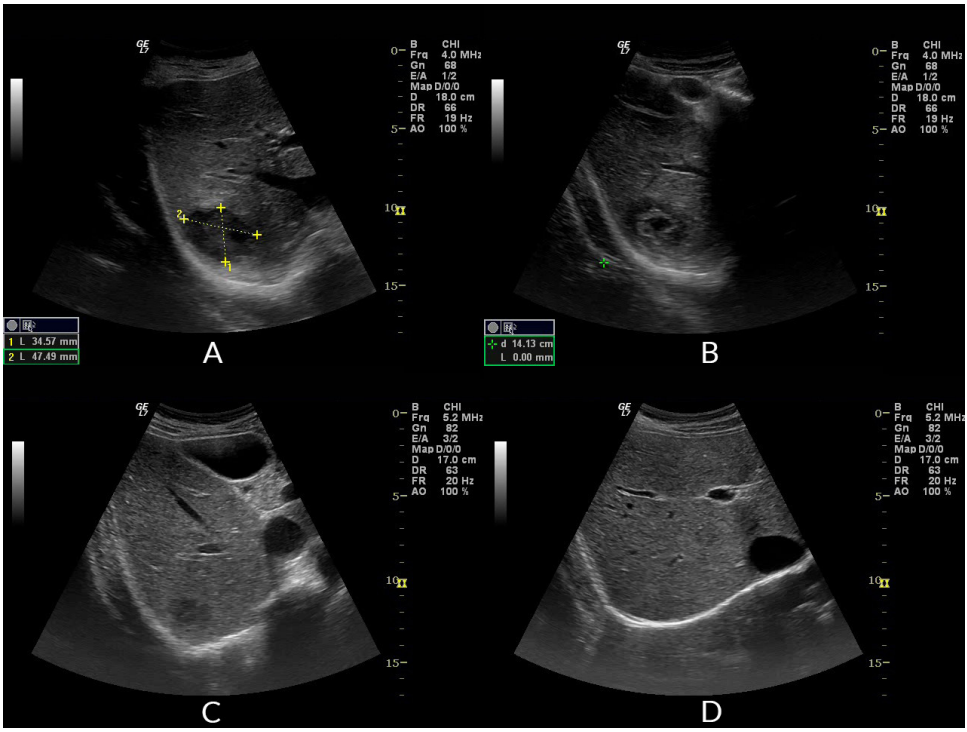
Około 500 milionów ludzi na świecie jest bezobjawowymi nosicielami *E. histolytica* i *E. dispar*. Około 80-90% zarażeń przebiega w postaci bezobjawowej kolonizacji (9), w pozostałych przypadkach *E. histolytica* powoduje zapalenie jelita grubego, rzadziej dochodzi do manifestacji pozajelitowej (3,16). Zarażenie to jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów z powodu chorób pasożytniczych na świecie, szacuje się, iż około 40.000–100.000 ludzi umiera rocznie z powodu pełzakowicy, a postać wątrobowa pełzakowicy jest jedną z istotnych przyczyn tych zgonów (2,9,17). Pełzakowy ropień wątrobowy (ALA, *amebic liver abscess*) jest znany od czasów antycznych, kiedy to opisywał go Hipokrates (460-377 B.C.), jako pierwszy powiązał *E. histolytica* i ALA *Losch* w 1912 roku [1,2,11].

OPIS PRZYPADKÓW

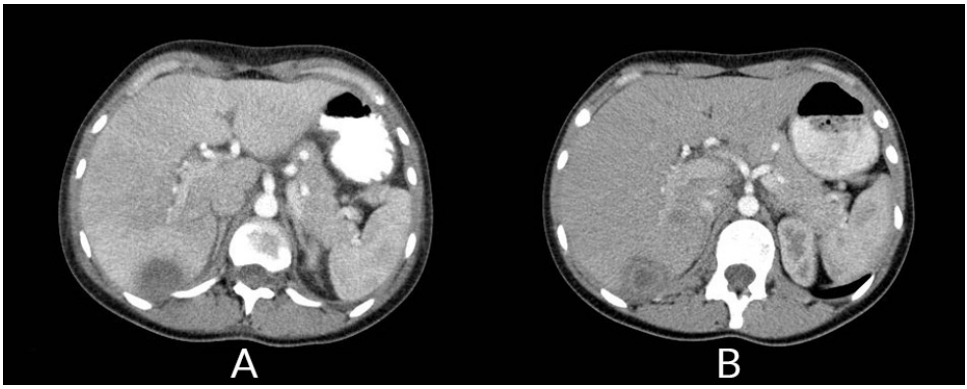
Przypadek nr 1.

30-letnia pacjentka przebywała turystycznie przez 1 miesiąc w Ameryce Środkowej (Meksyk, Belize, Honduras), w trakcie pobytu nie zgłaszała żadnych dolegliwości. Warunki pobytu były dobre, jednakże spożywała lokalne produkty z ulicznych stanowisk sprzedaży. Początek dolegliwości wystąpił po 3 miesiącach od powrotu do kraju, w postaci silnego, tępego bólu pod prawym łukiem żebrowym, z towarzyszącym nieznacznym bólem opłucnowym i suchym kaszlem. Z tego powodu po 2 dniach została przyjęta do szpitala, gdzie w kolejnym dniu wystąpiła gorączka 39°C z dreszczami. Pacjentka nie pamiętała epizodu biegunki w przeszłości, z chorób dodatkowych zgłaszała jedynie nietolerancję laktozy. W badaniach laboratoryjnych obserwowano nieznaczną anemię, monocytozę, podwyższone stężenie białka C reaktywnego (CRP) (110 mg/l), natomiast wartości leukocytów, neutrofilów, transaminazy alaninowej (ALT), transaminazy asparaginianowej (AST), fosfatazy alkalicznej i bilirubiny były w normie. W dwóch z trzech koproskopowych badań wykonanych w 2-dniowych odstępach stwierdzono obecność *E. histolytica* sensu lato, w jednym badaniu cysty i trofozoity, w drugim jedynie trofozoity. W teście serologicznym (ELISA) wykazano obecność przeciwciał klasy IgG anty-*E. histolytica* (czułość i swoistość diagnostyczna testu >95%). W badaniu ultrasonograficznym oraz TK wątroby uwidoczniono niejednorodny obszar o wymiarach 49x39 mm w segmencie VII wątroby oraz płyn w prawej jamie opłucnowej o szerokości 25 mm (rycina 1 i 2). Do leczenia włączono metronidazol (750 mg 3x dziennie, dożylnie), w 13. dniu hospitalizacji dołączoną paromomycynę (500 mg

3x dziennie, doustnie) i amoksycylinę z kwasem klawulanowym (1,2 g 3x dziennie, dożylnie). W ciągu 14. dni leczenia nie uzyskano poprawy klinicznej, nadal utrzymywała się gorączka, a regresja zmian w wątrobie była niezadowalająca, wymiary ropnia wynosiły 50x30 mm. Podjęto decyzję o przezskórnym drenażu ropnia w 16. dniu hospitalizacji. Badania molekularne zdrenowanej treści nie potwierdziły obecności *E. histolytica* ani *E. dispar*. W kolejnych dniach kontynuowano leczenie, obserwowano stopniowe ustępowanie ropnia oraz całkowitą regresję zmian odczynowych w klatce piersiowej i poprawę stanu klinicznego.



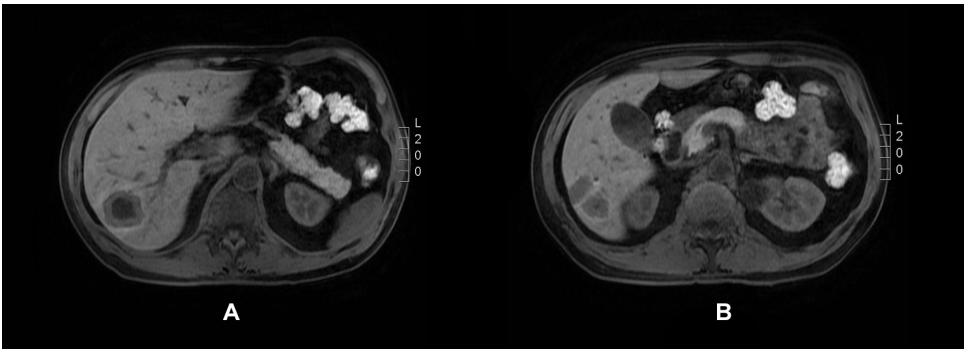
Rycina 1. Pełzakowy ropień wątroby w trakcie leczenia w obrazie USG
(A: dzień 6 po pierwszych objawach, B: dzień 18, C: dzień, 35 D: dzień 92)



Rycina 2. Pełzakowy ropień wątroby w obrazie tomografii komputerowej

Przypadek nr 2.

Pacjent lat 52 przebywał turystycznie w Beninie i Togo przez 2 miesiące. W trakcie pobytu czuł się dobrze, tuż po powrocie obserwowano krótką, przejściową biegunkę o małym nasileniu. Po około miesiącu po powrocie pojawiły się objawy w postaci gorączki do 39^{o}C z dreszczami oraz tępe dolegliwości bólowe brzucha pod prawym łukiem żebrowym. Pacjent był hospitalizowany w Szpitalu Rejonowym w miejscu zamieszkania, gdzie na podstawie TK jamy brzusznej postawiono podejrzenie ALA, włączono leczenie dożylne, a następnie doustne metronidazolem, uzyskując zmniejszanie się zmiany oraz normalizację parametrów zapalnych. Pacjenta przekazano do dalszego leczenia do naszego oddziału, wykonano kontrolne badanie MRI jamy brzusznej, stwierdzając na pograniczu segmentów VII/VI oraz w segmencie VI wątroby zmianę trzykomorową, o wymiarach 45x37x33 mm o płynowym sygnale wnętrza (dwie z trzech komór) (Rycina 3). Wykonano badania w kierunku obecności przeciwciał klasy IgG dla *E. histolytica* - uzyskano wynik ujemny. W badaniach krwi stwierdzono nieznacznie zmniejszenie wartości leukocytozy (3,62 x10^{3}/µl) i neutrofilów (1,6 x10^{3}/µl), wzrost ALT (47 U/l), AST (43 U/l), prawidłowe wartości fosfatazy alkalicznej, bilirubiny i CRP. U pacjenta kontynuowano terapię metronidazolem dożylnie w dawce 3x500 mg, włączono również dożylne leczenie piperacyliną z tazobaktamem 3x4,5 g. W kontrolnych badaniach obrazowych obserwowano zmniejszanie się ropnia. Wykonano badania w kierunku przeciwciał klasy IgG dla *Echinococcus sp.*, uzyskując wynik ujemny. W trzykrotnym badaniu kału nie stwierdzono pasożytów.



Rycina 3. Zmiana w wątrobie podejrzana o etiologię pełzakową w obrazie rezonansu magnetycznego

DYSKUSJA

Zgodnie z zaleceniami WHO terminu pełzakowica używamy kiedy dochodzi do zarażenia *E. histolityca (sensu lato)*, niezależnie od objawów klinicznych. W około 90% przypadków zarażenie jest bezobjawowe, w 10% dochodzi do rozwoju zapalenia jelita grubego. Wśród osób, u których doszło do objawów zapalenia jelita w około 10% dochodzi do manifestacji pozajelitowej, głównie wystąpienia ALA, natomiast inne lokalizacje pozajelitowe, jak serce, płuca, mózg, są bardzo rzadkie (8,19). Po dostaniu się cyst do przewodu pokarmowego dochodzi do przekształcenia ich w trofozoity, które następnie wraz z treścią jelitową dostają się do kątnicy, w której najczęściej dochodzi

do inwazji nabłonka jelitowego (17). Jeżeli na tym etapie inwazja pasożyta nie zostanie powstrzymana, trofozoity mogą dostać się do wątroby drogą krwi przez naczynia krążenia wrotnego i tworzą ognisko, najczęściej w prawym płacie wątroby (8). Do rozwoju ALA dochodzi z reguły w ciągu 5 miesięcy od narażenia na cysty *E. histolytica,* możliwe są jednak zachorowania po dłuższym okresie, nawet do 32 lat (4,20). W przypadku naszych pacjentów było to od 3-4 miesięcy od początku pobytu w strefie endemicznej.

W procesie diagnostycznym ALA istotny jest wywiad wskazujący na podróż do terenu endemicznego, objawy kliniczne, typowy obraz radiologiczny, badania serologiczne i parazytologiczne. Pobyt w regionie endemicznym jest szczególnie istotnym elementem wywiadu. Jakkolwiek teoretycznie istnieje możliwość zachorowania bez uprzedniej podróży w taki rejon, w praktyce zdarza się to bardzo rzadko. Pacjent nie zawsze uznaje za istotne poinformować lekarza o podróży, stąd to lekarz zawsze musi uwzględnić to pytanie w wywiadzie. W przypadku naszych pacjentów podróże dotyczyły regionów o niskim standardzie sanitarnym, ponadto pacjentka z przypadku nr 1 spożywała produkty z ulicznych punktów sprzedaży, co jest obarczone wysokim ryzykiem nabycia choroby zakaźnej. *E. histolytica* nie jest częstą przyczyną biegunek podróżnych, jeżeli pobyt trwa krócej niż 30 dni, jednakże na podstawie długości pobytu nie można wykluczać pełzakowicy, gdyż może do niej dojść nawet przy krótkich wyjazdach (16). U obu naszych pacjentów pobyty były co najmniej miesięczne. Typowe objawy pełzakowicy obejmują przede wszystkim tępy ból w prawym podżebrzu mogący promieniować do prawego ramienia, gorączkę, spadek masy ciała, powiększenie wątroby, natomiast żółtaczka występuje rzadko (6-10 %) (8,13). Jakkolwiek do wystąpienia ALA może dojść u obu płci w każdym wieku, to częściej dochodzi do tego u dorosłych mężczyzn w wieku pomiędzy 20-tym a 50-tym rokiem życia (21). Oboje nasi pacjenci mieli typowe objawy kliniczne, jakkolwiek nie są one swoiste tylko dla pełzakowicy. W części przypadków, kilka tygodni przed zasadniczymi objawami ALA, dochodzi do typowego obrazu czerwonki jelitowej w postaci bólu brzucha, krwistej lub śluzowo-krwistej biegunki. Może wystąpić nieczerwonkowe pełzakowe zapalenie jelita grubego, które od czerwonki odróżnia łagodniejszy przebieg, z przewagą śluzowej biegunki lub zupełny brak objawów jelitowych. U naszego pacjenta z przypadku nr 2 tuż po powrocie obserwowano krótką, przejściową biegunkę o małym nasileniu, mogła to być właśnie pierwsza manifestacja pełzakowicy. U pacjentki nr 1 natomiast ocena obecności fazy jelitowej nastręczała problemów. Z powodu obecnej u pacjentki nietolerancji laktozy, można przypuszczać, iż niewielkie dolegliwości jelitowe zostałyby przez pacjentkę potraktowane jako typowe, okresowe dolegliwości wynikające z tej nietolerancji. Dolegliwości do których dochodzi w wyniku ALA, mogą występować w wielu różnych schorzeniach, w diagnostyce różnicowej należy uwzględnić ropień o innej etiologii, proces nowotworowy wątroby lub jej okolicy, bąblowicę, zapalenie dróg żółciowych. Różnicowanie z ropniem bakteryjnym jest szczególnie istotne, gdyż jego śmiertelność wynosi 20-60% i jest tym wyższa, im później włączane jest adekwatne leczenie (10,12). Badania podstawowe w przypadku pełzakowicy nie są w stanie potwierdzić zarażenia, pomagają natomiast w diagnostyce różnicowej, np. bardzo wysokie wartości CRP mogą sugerować ropień bakteryjny wątroby. W badaniach laboratoryjnych, zwłaszcza u pacjentów z dłużej obecnym ALA, obserwuje się leukocytozę bez eozynofilii, anemię i podwyższony poziom fosfatazy zasadowej, rzadziej transaminaz (3,17). Najgroźniejszym powikłaniem jest pęknięcie ropnia i rozsiew jego zawartości do jam ciała: otrzewnowej, opłucnowej i do osierdzia (8,13).

Diagnostyka parazytologiczna jest istotna, ale napotyka kilka trudności. Pełzakowica jest wynikiem zarażenia *E. histolytica, E. dispar* uznaje się za niepatogenny, natomiast patogenność *E. moshkovskii* nie została ustalona, być może mogą powodować rzadko objawowe zakażenia. Badanie parazytologiczne kału jest z reguły ujemne w momencie wystąpienia ALA i tak było u naszego pacjenta nr 2. Jeśli *E. histolytica* jest obecna w jelicie, to klasyczna metoda oceny mikroskopowej stolca pozwala w świeżej próbce dostrzec cysty *Entamoeba*, ale nie pozwala na rozróżnienie *E. histolytica* od *E. dispar* i *E. moshkovskii*, które nie są patogenne. Reakcja PCR i różne jej modyfikacje odznaczają się wysoką czułością (>70%) i swoistością (>90%) (18). Badania serologiczne są nieprzydatne w diagnostyce zarażenia u osób zamieszkujących regiony endemiczne, gdyż w tej grupie pacjentów odsetek dodatnich wyników przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgG jest wysoki i to niezależnie od obecności lub braku cech amebiazy. Badania serologiczne cechują się natomiast wysoką czułością, jak i swoistością u osób niedawno podróżujących do terenów endemicznych (7,15,18). Trzeba mieć jednakże na uwadze, że w niewielkim jednak odsetku przypadków, odpowiedź humoralna może być opóźniona lub nawet nieobecna (6,12).

Badania obrazowe, USG, TK lub MR choć są szczególnie ważne w diagnostyce ALA, jednakże nie dają patognomicznego obrazu (13). Rycina 1 pokazuje stopniowe wycofywanie się ropnia, aż do pełnej odbudowy makroskopowej struktury wątroby. Czas regeneracji wątroby jest długi i przekracza całkowity czas leczenia, w naszym przypadku ostatnie zdjęcie USG zostało wykonane w 92 dniu od początku objawów klinicznych. Zdjęcie wykonane w 35 dniu wykazuje jeszcze wyraźne zmiany w wątrobie.

Przypadek nr 1 nie budzi wątpliwości diagnostycznych, warto jednak zwrócić uwagę na ujemny wynik badania PCR próbki materiału pobranego z treści ropnia. Mimo, że PCR cechuje się wysoką czułością i swoistością, to jednak na końcowy wynik badania ma wpływ wiele czynników, niezależnych czasami od laboratorium wykonującego badanie. W drugim opisanym przypadku wywiad epidemiologiczny i obraz kliniczny odpowiadają pełzakowicy. Na uwagę zasługuje fakt, że przy ujemnym wyniku badań serologicznych w kierunku bąblowicy, badaniem jednoznacznie wskazującym na etiologię pełzakowicy był wykonany przed hospitalizacją w naszym oddziale MRI jamy brzusznej. W związku z niejasnym obrazem prowadzono leczenie jak w pełzakowicy, jednakże poszerzono zakres spektrum antybiotykowego.

PODSUMOWANIE

W diagnostyce zmian w wątrobie u osób powracających z regionów tropikalnych należy uwzględnić schorzenia pasożytnicze, w tym pełzakowicę. W badaniach obrazowych zmiana tkanki wątrobowej w miejscu ALA widoczna jest wiele tygodni po zakończonym leczeniu. W sytuacjach niejednoznacznych, ale wskazujących na ALA, należy przeprowadzić kurs leczenia specyficznego. W profilaktyce pełzakowicy istotne jest, aby turyści udającym się do krajów o niskim standardzie sanitarnym nie spożywali lokalnych produktów z ulicznych stanowisk sprzedaży.

PIŚMIENNICTWO

1. *Adams F*. The Genuine Works of Hippocrates. Vol. 1. New York: W Wood and Sydenham Company, London, UK; 1886.
2. *Alam F, Salam MA, Hassan P* i inni. Amebic liver abscess in northern region of Bangladesh: sociodemographic determinants and clinical outcomes. BMC Res Notes 2014; 7: 625.
3. *Haque R, Huston CD, Hughes M* i inni. Amebiasis. New Engl J Med 2003; 348: 1565-73.
4. *Hoffbrand BI.* Amoebic liver abscess presenting thirty two years after acute amoebic dysentery. Proc R Soc Medicine 1975; 68: 593–4.
5. *Hung CC, Deng HY, Hsiao WH* i inni. Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. Arch Intern Med 2005; 165: 409.
6. *Knobloch J, Mannweiler E*. Development and persistence of antibodies to Entamoeba histolytica in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 727–32.
7. *Kraoul L, Adjmi H, Lavarde V* i inni. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. J Clin Microbiol 1997; 35: 1530–2.
8. *Lachish T, Wieder-Finesod A, Schwartz E*. Amebic liver abscess in Israeli travelers: A retrospective study. Am J Trop Med Hyg 2016; 94: 1015-9.
9. *Lee K-C, Lu C-C, Hu W-H* i inni. Colonoscopic diagnosis of amebiasis: A case series and systematis review. Int J Colorectal Dis 2015; 30: 31-41.
10. *Lodhi S, Sarwari AR, Muzammil M* i inni. Features distinguishing amoebic from pyogenic liver abscess: a review of 577 adult cases. Trop Med Int Health 2004; 9: 718–23.
11. *Losch F*. Massentafle Entwickenlong von amebon in dickdarm. Arch F Path Anat 1875; 65: 196–211.
12. *Marn H, Ignatius R, Tannich E* i inni. Amoebic liver abscess with negative serologic markers for Entamoeba histolytica: mind the gap! Infection 2012; 40: 87–91.
13. *Nespola B, Betz V, Brunet J* i inni. First case of amebic liver abscess 22 years after the first occurrence. Parasite 2015; 22: 20.
14. *Peterson KM, Singh U, Petri WA Jr*. Enteric Amebiasis. In: Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice, 3rd/ ed, Guerrant R, Walker DH, Weller PF (Eds), Saunders Elsevier, Philadelphia 2011. p.614.
15. *Robert R, Mahaza C, Bernard C* i inni. Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis. J Clin Microbiol 1990; 28: 1422–4.
16. *Skappak C, Akierman S, Belga S* i inni. Invasive amoebiasis: A review of *Entamoeba* infections highlighted with case reports. Can J Gastroenterol Hepatol 2014; 28: 355-9.
17. *Stanley SL*. Amoebiasis. Lancet 2003; 361: 1025-34.
18. *Tanyuksel M, Petri WA Jr*. Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 713–29.
19. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28–29 January, 1997. Epidemiol Bull 18: 13–4.
20. *Wuerz T, Kane JB, Boggild AK* i inni. 2001. A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting. Can J Gastroenterol 2001; 26: 729–33.
21. *Ximenez C, Moran P, Rojas L* i inni. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. Infect Genet Evol 2009; 9: 1023–32.

Otrzymano: 7 XI 2016 r.
Adres Autora: 31-531 Kraków, ul. Śniadeckich 5, Klinika Chorób Zakaźnych Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie
e-mail: jacek.czepiel@uj.edu.pl

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 43 - 48

Wykorzystanie serologicznych i molekularnych metod w diagnostyce pierwotnego ostrego zapalenia wątroby spowodowanego przez ludzki herpeswirus typu 6 – opis przypadku

Serological and molecular methods in diagnostics of primary acute hepatitis caused with human herpesvirus type 6 – a case report

Marta Rybka[1], Maciej Przybylski[2,3], Paulina Machura[2,3], Tomasz Dzieciątkowski[2,3], Rafał Krenke[1], Marta Wróblewska[2,4]

[1]Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
[2] Zakład Mikrobiologii SP CSK w Warszawie
[3] Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
[4] Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Opisano przypadek ostrego zapalenia wątroby spowodowanego przez pierwotne zakażenie ludzkim herpeswirusem typu 6 u 18-letniego mężczyzny bez zaburzeń odporności. Przeprowadzono badania wirusologiczne z wykorzystaniem technik serologicznych oraz metody real-time PCR w kierunku wirusa cytomegalii, herpeswirusa typu 6 oraz wirusa Epsteina-Barr. Wykazano przydatność wielokierunkowych badań z użyciem techniki real-time PCR w wykrywaniu i monitorowaniu zakażeń spowodowanych przez herpeswirusy, zwłaszcza o niskim poziomie replikacji.

Słowa kluczowe: zapalenie wątroby, zakażenia herpeswirusami, ludzki herpeswirus typu 6, techniki serologiczne, real-time PCR

ABSTRACT

Introduction: HHV-6 has been identified as the etiologic agent of exanthema subitum in infants and acute febrile illness in young children, although primary HHV-6 infection in immunocompetent adolescents and adults is very rare. We report the case of acute hepatitis in an 18-year-old man without any immunological dysfunctions.

Material and methods: Full virological examination of sera samples was performed. Specimens were tested for the presence of specific anti-EBV and anti-HHV-6 antibodies and also for the presence of DNA of other herpesviruses, using qPCR assays.

Results: Obtained results demonstrated the presence of HHV-6 DNA in all examined sera samples and IgM-class antibodies against HHV-6 in the second specimen. No other etiologic agents were found that are known to induce hepatitis. Hence, patient was diagnosed as having acute hepatitis triggered by HHV-6.
Conclusions: We found that qPCR is a very useful tool for the detection of different herpesvirus infections, especially with low-copy viraemia in clinical specimens.

Key words: hepatitis, herpesvirus infections, human herpesvirus 6, serological methods, real-time PCR

WSTĘP

Ludzki herpeswirus typu 6 (ang. human herpesvirus type 6; HHV-6) jest patogenem występującym powszechnie w populacji ludzi na całym świecie (11). Obecnie pod wspólną tradycyjną nazwą HHV-6 występują dwa osobne gatunki: HHV-6A i HHV-6B charakteryzujące się pewnymi różnicami w sekwencji nukleotydów oraz budowie antygenowej (4). Zaliczane są one do podrodziny *Betaherpesvirinae*, zaś analiza ich genomów wykazuje bliskie pokrewieństwo z ludzkim herpeswirusem typu 7 (ang. human herpesvirus type 6; HHV-7) oraz wirusem cytomegalii (CMV) (4, 11).

U większości ludzi zakażenie pierwotne o etiologii HHV-6 ma miejsce we wczesnym dzieciństwie i przebiega najczęściej bezobjawowo. Zakażenie objawowe pierwotne manifestuje się jako rumień nagły (łac. *exanthema subitum*), bądź też jako gorączka z towarzyszeniem limfadenopatii (8, 11). Następnie wirus przechodzi w stan latencji w śliniankach, monocytach, lub też komórkach progenitorowych szpiku (4). HHV-6 jak każdy beta-herpeswirus jest patogenem przede wszystkim limfotropowym (8), ale wykazuje też tropizm do innych narządów: serca, wątroby, ośrodkowego układu nerwowego, płuc oraz śledziony (8, 9). Zakażenia narządowe wywołane przez HHV-6 obserwuje się przede wszystkim u pacjentów z zaburzeniami odporności, u których mogą objawiać się zapaleniem wątroby, zespołem mononukleozopodobnym, a nawet prowadzić do chorób limfoproliferacyjnych (5, 8, 11). Powyższe zespoły kliniczne są jednak bardzo rzadko opisywane u osób dorosłych z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym (7).

Mimo szczególnego znaczenia klinicznego zakażeń o etiologii HHV-6 u osób poddanych immunosupresji, rutynowa diagnostyka w tym kierunku wykonywana jest sporadycznie. Ze względu na upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego u chorych opisanych powyżej, podstawową metodą diagnostyczną są testy PCR, gdyż tradycyjne badania serologiczne mogą prowadzić do uzyskania wyników niemiarodajnych, co jest związane z charakterystycznym dla immunosupresji zaburzeniem syntezy immunoglobulin (6).

Celem pracy była identyfikacja technikami serologicznymi oraz molekularnymi czynnika zakaźnego odpowiedzialnego za pierwotne zapalenie wątroby u pacjenta bez dysfunkcji układu odpornościowego.

OPIS PRZYPADKU

Pacjent w wieku lat 18, bez zaburzeń odporności, nieleczący się przewlekle, został przyjęty do Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii WUM z powodu

stanów gorączkowych do 39,5°C oraz objawów dyzurycznych. Dodatkowo chory zgłaszał bóle w okolicy stawów kolanowych, które pojawiły się ok. 1 miesiąca przed przyjęciem do szpitala, którym jednak nie towarzyszyły inne dolegliwości. W leczeniu ambulatoryjnym zastosowano początkowo ciprofloksacynę (2 x 250 mg), a następnie do leczenia włączono cefuroksym (2 x 250 mg). Chory negował przyjmowanie środków psychoaktywnych i spożywanie używek. W wywiadach dotyczących chorób przebytych odnotowano przebyte 8 lat wcześniej pozaszpitalne zapalenie płuc, a w wywiadach rodzinnych - zespół Gilberta rozpoznany u brata.

W badaniu przedmiotowym przy przyjęciu do szpitala zwracała uwagę suchość błon śluzowych jamy ustnej, obecność pęcherzy surowiczych na tylnej ścianie gardła, wyczuwalne palpacyjnie węzły chłonne oraz powiększenie śledziony i wątroby. Diagnostyka obrazowa (USG) jamy brzusznej potwierdziła hepatosplenomegalię bez zmian ogniskowych w tych narządach oraz powiększenie węzła chłonnego przy wnęce wątroby. Badanie RTG klatki piersiowej nie wykazało nieprawidłowości. W wynikach badań laboratoryjnych zwracała uwagę obniżona liczba leukocytów z granulocytopenią i małopłytkowością, podwyższone stężenia białka C-reaktywnego (CRP), prokalcytoniny, D-dimeru i bilirubiny oraz zwiększoną aktywność γ-glutamylotranspeptydazy (GGTP) i enzymów wątrobowych: aminotransferazy alaninowej (ALT) - 85 U/L i aminotransferazy asparaginianowej (AST) - 90 U/L. Posiewy krwi w kierunku bakterii tlenowych i beztlenowych były jałowe.

Na podstawie objawów klinicznych, ujemnych wyników badań w kierunku HBV, HCV i HIV oraz po hematologicznych i otolaryngologicznych konsultacjach wysunięto podejrzenie stanów gorączkowych w przebiegu mononukleozy zakaźnej, do różnicowania z zakażeniem CMV. Ponieważ przeprowadzone w dalszej kolejności oznaczenia serologiczne i molekularne w kierunku EBV i CMV dały wyniki ujemne, zdecydowano o rozszerzeniu zakresu badań wirusologicznych. Na ich podstawie u chorego rozpoznano zespół mononukleozopodobny z towarzyszącym ostrym zapaleniem wątroby w przebiegu zakażenia ludzkim herpeswirusem typu 6.

W trakcie leczenia obserwowano stopniowe ustąpienie dolegliwości i powrót do prawidłowej temperatury ciała. W kontrolnych wynikach badań laboratoryjnych wykazano początkowo wzrost aktywności AST: 180 U/l i ALT: 345 U/l, a następnie tendencję spadkową poziomu transaminaz oraz normalizację parametrów stanu zapalnego. W kontrolnym badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej stwierdzono zmniejszenie wymiarów wątroby oraz śledziony. Pacjenta wypisano do domu po upływie 10 dni w stanie ogólnym dobrym.

MATERIAŁ I METODY

Do badania swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko EBV i HHV-6 w klasach IgM i IgG wykorzystano próbki surowicy krwi pobranej w dniu 2 i 14 po przyjęciu pacjenta do szpitala. Badania wykonywane były z użyciem komercyjnych testów immunoenzymatycznych firmy IBL® (w kierunku EBV) oraz PanBio® (w kierunku HHV-6) według zaleceń producentów. Wyniki oznaczenia przeciwciał w obu klasach wyrażane były w jednostkach arbitralnych (AU/ml) oraz jednostkach PanBio (PanBio units; PBU) .

Do badania liczby kopii DNA CMV, EBV oraz HHV-6 wykorzystano testy oparte na technice real-time PCR (qPCR). Izolację DNA przeprowadzono przy użyciu automatycznego systemu ekstrakcji kwasów nukleinowych EasyMAG NucliSense (BioMerieux®),

zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Oznaczenia w kierunku CMV i EBV przeprowadzane były aparatem Dx96 (BioRad®), z użyciem komercyjnych testów CMV R--Gene i EBV R-gene (BioMerieux®). Do wykrywania i oceny ilościowej HHV-6 wykorzystano metodę *"in-house"* qPCR (2), wykrywającą gen kodujący DNA-polimerazę HHV-6, o progu czułości około 50 kopii DNA wirusa na mililitr materiału badanego, a oznaczenia wykonywano w aparacie LightCycler 96 (Roche Diagnostics®).

Wirusowe DNA wykryto ogółem w 3 próbkach surowicy krwi, pobranej w 2, 7 i 14 dobie hospitalizacji.

WYNIKI I OMÓWIENIE

W różnicowaniu przyczyn objawów stwierdzonych u opisanego pacjenta na pierwszym miejscu uwzględniono zakażenia wirusowe, w tym mononukleozę zakaźną. Jednakże, wstępne badanie z zastosowaniem testu aglutynacji lateksowej w kierunku mononukleozy dało wynik ujemny. Następne badania w kierunku mononukleozy, w których oznaczano miano swoistych przeciwciał anty-EBV w klasie IgM z wykorzystaniem techniki ELISA także nie potwierdziły zakażenia o tej etiologii. Uzyskano także ujemne wyniki testów molekularnych w kierunku DNA CMV i EBV. W tej sytuacji poszukiwano innych zakażeń wirusowych mogących stanowić przyczynę obserwowanych objawów klinicznych.

W wyniku amplifikacji metodą qPCR DNA izolowanego z surowicy krwi pacjenta pobranej w 2 dniu hospitalizacji zaobserwowano produkty specyficzne dla HHV-6, początkowo na poziomie 280 kopii/ml. W kolejnej próbce (dzień +7) wykryto wzrost poziomu DNA HHV-6 z 280 do 720 kopii/ml, który następnie uległ obniżeniu do <150 kopii/ml (próbka pobrana w dniu +14).

Wykrywanie przeciwciał przeciwko HHV-6 w klasach IgM i IgG testem ELISA w pierwszej próbce surowicy (dzień +2) dało wynik ujemny. Powtórne oznaczenie wykonane po upływie dwóch tygodni wykazało obecność przeciwciał klasy IgM, przy dalszym braku przeciwciał klasy IgG.

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki wskazują, że w przedstawionym przypadku pierwotne zakażenie spowodowane przez herpeswirusa typu 6 było przyczyną ostrego zapalenia wątroby u pacjenta bez zidentyfikowanych zaburzeń odporności. Większość z opisywanych w piśmiennictwie zapaleń wątroby o etiologii HHV-6 dotyczyła pacjentów z niedoborami układu immunologicznego (8,9), ponadto są one zazwyczaj wynikiem reaktywacji wirusa ze stanu latencji, a nie skutkiem zakażenia pierwotnego. Wykonane badania serologiczne i molekularne wykluczyły możliwość zakażenia wirusami pierwotnie hepatotropowymi (HAV, HBV i HCV) oraz wirusami cechującymi się wtórnym hepatotropizmem (CMV, EBV). Stwierdzono natomiast obecność DNA HHV-6 w próbkach surowicy chorego. W próbce surowicy pobranej w 14 dni po przyjęciu do szpitala wykryto swoiste przeciwciała klasy IgM, przy braku przeciwciał klasy IgG. Wskazuje to na wystąpienie zakażenia pierwotnego herpeswirusem typu 6, które spowodowało ostre zapalenie wątroby. Jest to niezwykłe zjawisko, jako że większość zakażeń pierwotnych HHV-6 ma miejsce we wczesnym dzieciństwie, a u ok. 90% populacji dorosłej wykrywa się przeciwciała klasy IgG (9).

Dotychczas w piśmiennictwie światowym zaprezentowano 14 przypadków zapalenia wątroby o podłożu HHV-6 u pacjentów immunokompetentych (1). W większości opisywanych przypadków początkowe objawy były nieswoiste, przy czym często o ich wywołanie podejrzewano zakażenie bakteryjne. Czas trwania, nasilenie i charakter objawów towarzyszących samemu zapaleniu wątroby wahały się od lekkiego zakażenia, przypominającego swoim przebiegiem przypadek opisywany w niniejszej pracy, aż do *hepatitis fulminans* z towarzyszącym uszkodzeniem wielonarządowym, przy czym czynniki predysponujące do ciężkich postaci choroby nie zostały zidentyfikowane. Bardzo ciężki przebieg zakażenia dotyczył sześciu przypadków, z towarzyszącą martwicą wątroby prowadzącą do niewydolności narządu; trzy spośród nich miały charakter nadostry i zakończyły się zgonem, a dwóm towarzyszyły zjawiska autoimmunologiczne wskazujące na niekontrolowaną reakcję zapalną. W czterech przypadkach o ciężkim przebiegu liczba kopii DNA HHV-6 w mililitrze krwi osiągała setki tysięcy w momencie największego nasilenia, przy czym obserwowano znaczną dynamikę narastania DNAemii. Jednak pozostałe dwa przypadki przebiegały z DNAemią na poziomie od kilkuset do kilku tysięcy kopii/ml; z drugiej zaś strony dwa przypadki o lekkim przebiegu przebiegały z masywną i szybko narastającą wiremią. Oznacza to, że dwa najbardziej logiczne parametry brane pod uwagę w ocenie rokowania zakażenia ogólnoustrojowego (dynamika narastania wiremii i najwyższa liczba kopii DNA/ml) nie zawsze muszą być miarodajne z klinicznego punktu widzenia. Interesujący jest fakt wysokiego odsetka zakażeń pierwotnych HHV-6: serokonwersję stwierdzono u sześciu spośród dziesięciu pacjentów, u których przeprowadzono badania serologiczne. Jednak i tutaj nie obserwowano jednoznacznego związku między nasileniem objawów, a zjawiskiem zakażenia pierwotnego lub wynikającego z reaktywacji latentnej formy wirusa. Co więcej, analogicznie jak w przypadku prezentowanym w niniejszej pracy, serokonwersja stwierdzana była wtórnie wobec rozpoznania zakażenia HHV-6 przy użyciu technik biologii molekularnej (11). Stosunkowo częste były współtowarzyszące zakażenia innymi gatunkami z rodziny *Herpesviridae*: wirusem cytomegalii, wirusem opryszczki zwykłej oraz wirusem Epsteina-Barr, przy czym ten ostatni nie został wykryty w przebiegu zakażenia, lecz dopiero w badaniach próbek wątroby wykonanych *post-mortem*.

Obserwowane zmniejszanie się poziomu wiremii w opisanym w niniejszej pracy przypadku świadczy o prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego pacjenta, i w dalszej konsekwencji sugeruje przejście infekcji z formy produktywnej w zakażenie latentne. Pomimo trudności występujących w prawidłowym rozpoznaniu zakażenia herpeswirusem typu 6 jako etiologicznego czynnika ostrego zapalenia wątroby, zwłaszcza na wczesnym etapie rozwoju choroby, zakażenia HHV-6 powinny być brane pod uwagę w takich przypadkach, zwłaszcza gdy wyniki rutynowych badań w kierunku innych wirusów są ujemne. Dotyczy to w szczególności pacjentów z zaburzeniami funkcjonowania układu odpornościowego, choć jak w opisanym przypadku, może też dotyczyć osób ogólnie zdrowych.

PIŚMIENNICTWO

1. *Charnot-Katsikas A, Baewer D* i inni. Fulminant hepatic failure attributed to infection with human herpesvirus 6 (HHV-6) in an immunocompetent woman: A case report and review of the literature. J Clin Virol 2016; 75: 27-32
2. *DzieciątkowskiT, Przybylski M*, *Gieryńska M* i inni. Wykorzystywanie metody real-time PCR do wykrywania DNA herpeswirusa typu 6. Med Dośw Mikrobiol 2008; 60: 259-65.

3. *Härmä M, Höckerstedt K, Lautenschlager I*. Human herpesvirus-6 and acute liver failure Transplantation 2003; 76: 536-9.
4. *Krug LT, Pellett PE*. Roseolovirus molecular biology: recent advances. Curr Opin Virol 2014; 9: 170-7.
5. *Osińska E, Tomaszewska A, Dzieciątkowski T*. Zakażenia betaherpeswirusami u osób z niedoborami odporności. Post Mikrobiol 2009; 48:267-76.
6. *Saxinger C, Polesky H, Eby N i inni*: Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in U.S. populations. J Virol Methods 1988; 21: 199-208.
7. *Sobue R, Miyazaki H, Okamoto M* i inni. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. N Engl J Med 1991; 324: 1290.
8. *Stoeckle MY*. The spectrum of human herpesvirus 6 infection: from roseola infantum to adult disease. Annu Rev Med 2000; 51: 423-30.
9. *Tomaszewska A, Nasiłowska-Adamska B, Dzieciątkowski T i inni*. Simultaneous human herpesvirus 6-associated encephalitis and Guillain-Barré syndrome in a patient after matched unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. Arch Med Sci 2010; 6: 288-90.
10. *Yoshikawa T*. Human herpesvirus 6 causes hepatitis in transplant recipients. Intern Med 2006; 45: 417-8.
11. *Zerr DM*. Human herpesvirus 6: a clinical update. Herpes 2006;13:20-4.

Otrzymano: 10 XI 2017
Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
e-mail: maciej@conexion.pl

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 49 - 54

Występowanie wirusów brodawczaka ludzkiego u pacjentów z polipami jelita grubego

The prevalence of human papillomaviruses in patients with colon polyps

Beata Młynarczyk-Bonikowska[1], Jacek Muszyński[2], Ksenia Szymanek-Majchrzak[3], Bartłomiej Ziółkowski[2], Grażyna Młynarczyk[3], Magdalena Malejczyk[1], Sławomir Majewski[4]

[1]Zakład Diagnostyki Chorób Przenoszonych Drogą Płciową
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa
[2]Klinika Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa
[3]Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa
[4]Klinika Dermatologii i Wenerologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Potencjalna rola zakażenia HPV w patogenezie polipów i raka jelita grubego pozostaje niewyjaśniona. Celem pracy było zbadanie obecności DNA HPV 6,11, 16 i 18 w wycinkach z polipów jelita grubego. Zbadano biopsje od 24 pacjentów (23 z polipami i 1 z rakiem) metodą real time PCR. W żadnej z badanych próbek nie wykryto onkogennych typów HPV 16 i 18. HPV 11 wykryto w 11 przypadkach, w tym we wszystkich badanych próbkach z polipów cewkowo-kosmkowych. W 5 próbkach pochodzących z polipów jelita grubego i 1 z raka wykryto HPV6. Powyższy wynik może sugerować udział HPV 6 i 11 w patogenezie niektórych przypadków polipów jelita grubego oraz brak udziału onkogennych HPV.

Słowa kluczowe: *polipy jelita grubego, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18*

ABSTRACT

Introduction: Potential role of HPV infection in pathogenesis of colon polyps and cancer remains undetermined. The aim of the study was to investigate the prevalence of DNA of HPV- 6, -11, -16 and -18 in the biopsies from colon polyps.

Material and Methods: We investigated the biopsies from 24 patients (23 from colon polyps and 1 from colon cancer) of Department of Gastroenterology Medical University

of Warsaw using Real time PCR HPV-6/11. Real-TM (Sacace Biotechnologies) was performed on termocycler Smart Cycler Dx.
Results: We didn't detect oncogenic HPV16 and HPV18 in any of the investigated specimens. HPV-11 was present in 11 patients including all patients with adenoma tubulo-villosum. We detect HPV6 in 5 samples from polyps and 1 from colon cancer.
Conclusions: HPV 6 and HPV 11 could play a role in pathogenesis some colon polyps but the final conclusions demand further investigations. Oncogenic HPV 16 and 18 probably don't play any role in colon polyps pathogenesis.

Key words: colon polyps, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18

WSTĘP

Polipy jelita grubego są zjawiskiem częstym, zwłaszcza u osób po 55 r.ż.. Kolonoskopowe badania przesiewowe dotyczące 12 574 osób między 55 a 64 r.ż. ze Szwecji, Norwegii, Polski i Holandii wykazały obecność polipów typu adenoma u 30,7%, w tym u 10,4% zmiany o wysokim ryzyku transformacji nowotworowej. Rak jelita grubego występował u 0,5% badanych (5). Zwiększone ryzyko wystąpienia polipów jelita grubego może wiązać się z czynnikami genetycznymi (istnieją genetycznie uwarunkowane zespoły wiążące się z ich występowaniem) oraz niektórymi czynnikami środowiskowymi tj. palenie tytoniu, alkohol, dieta, brak aktywności fizycznej (2). Na bazie polipów gruczołowych może rozwinąć się rak jelita grubego. Czynniki sprzyjające wystąpieniu raka są zbliżone do powyżej wymienionych czynników zwiększających ryzyko rozwoju polipów (4).

Zakażenia genitalnymi wirusami brodawczaka ludzkiego (Human papillomaviruses-HPV) są uważane za najczęstszą chorobę przenoszoną drogą płciową. Większość osób aktywnych seksualnie, miało w trakcie swojego życia kontakt z tymi wirusami. Zależnie od zdolności do powodowania nowotworów złośliwych i zmian przednowotworowych HPV można podzielić na onkogenne lub wysokiego ryzyka (najczęstsze typy to HPV-16 i -18) oraz nieonkogenne lub niskiego ryzyka (najczęściej występują HPV-6 i HPV-11). Udowodniono udział onkogennych HPV w patogenezie raka szyjki macicy, okolic odbytu, odbytnicy, sromu, prącia oraz raków głowy i szyi (18). Możliwy, chociaż nie w pełni potwierdzony, jest udział onkogennych HPV w patogenezie raka jamy ustnej, warg i przełyku (9). Wirusy niskiego ryzyka są odpowiedzialne za większość przypadków brodawek płciowych (kłykcin kończystych) występujących na narządach płciowych, w okolicy odbytu i rzadko w jamie ustnej. Ponadto wirusy te są odpowiedzialne za kłykciny olbrzymie Buschke-Löwensteina, a także za większość przypadków brodawczaków krtani (11). Możliwe działanie HPV jako czynnika sprzyjającego powstawaniu zmian łagodnych i złośliwych w jelicie grubym pozostaje kontrowersyjne.

Celem pracy było zbadanie obecności DNA HPV-6, -11, -16 i -18 w wycinkach z polipów jelita grubego pobranych w trakcie kolonoskopii od pacjentów Kliniki Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych WUM.

MATERIAŁ I METODY

Pobrano wycinki z jelita grubego od 24 pacjentów Kliniki Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych WUM. 12 wycinków pobrano z polipów cewkowych, 6 z polipów cewkowo-kosmkowych, 3 z polipów kosmkowych i 2 z polipów hyperplastycznych. Jedna próbka pochodziła z raka jelita grubego. Ponadto jeden pacjent z polipem cewkowo-kosmkowym miał dodatkowo raka jelita grubego. Próbki przechowywano w -70°C, a następnie izolowano z nich DNA. Wykrywanie obecności genetycznego materiału HPV typu 6 i 11 oraz typu 16 i 18, przeprowadzano przy zastosowaniu techniki real-time PCR w aparacie Smart CyclerDx firmy Cepheid. Uzyskane wyniki odczytywano i analizowano przy użyciu oprogramowania Smart Cycler Dx Software. Do detekcji oraz typowania HPV-6/11 posłużono się komercyjnym zestawem HPV-6/11 Real-TM, firmy Sacace Biotechnologies. Jako wewnętrzną kontrolę reakcji zastosowano zestaw sond i starterów komplementarnych do genu ludzkiej beta-globiny (detekcja w kanale ROX (Orange)/Texas Red). Wyniki dla wirusa HPV-6 odczytywano w kanale FAM (Green), dla HPV11 w kanale JOE (Yellow)/Cy3/HEX. Do detekcji oraz typowania HPV16/18 posłużono się komercyjnym zestawem HPV-16/18 Real-TM Quant, firmy Sacace Biotechnologies. Wyniki dla wewnętrznej kontroli (gen beta-globiny) odczytywano w kanale Joe/HEX/Yellow. Wyniki dla wirusa HPV-16 odczytywano w kanale FAM (Green), dla HPV-18 w kanale Rox/Orange. Wynik badania uznawano za pozytywny, jeśli uzyskano produkt reakcji amplifikacji specyficzny dla genu wirusa HPV-6, -11, -16 lub -18, przy jednocześnie uzyskanym dodatnim wyniku kontroli pozytywnej oraz braku produktów w kontroli negatywnej reakcji PCR. Wynik negatywny (brak swoistych produktów reakcji amplifikacji), uznawano za prawdziwie negatywny, jeżeli jednocześnie uzyskano dodatni wynik dla kontroli pozytywnej, brak produktów w kontroli negatywnej reakcji oraz uzyskano produkt PCR dla genu ludzkiej beta-globiny w każdej analizowanej mieszaninie reakcyjnej.

WYNIKI

W żadnej z badanych próbek nie wykryto DNA onkogennych HPV-16 ani HPV-18. Natomiast w 11 próbkach, w tym we wszystkich badanych wycinkach z polipów cewkowo-kosmkowych, stwierdzono obecność DNA HPV-11. DNA HPV 6 wykryto łącznie w 6 badanych próbkach. U jednego pacjenta z polipem cewkowo-kosmkowym wykryto oba wirusy (HPV-6 i HPV-11). U pacjenta z rakiem i polipem jelita grubego stwierdzono obecność HPV-11, a u pacjenta tylko z rakiem HPV-6. U żadnego z badanych pacjentów nie stwierdzono obecności onkogennych HPV-16 i -18. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Występowanie wirusów HPV-6, HPV-11, HPV-16 i HPV-18 w badanych wycinkach

Rozpoznanie histopatologiczne	HPV-6 +	HPV-11+	HPV 16 +i 18+
Adenoma tubulare	4/12 (33,3%)	2/12 (16,7%)	0/12(0%)
Adenoma villosum	0/3 (0%)	1/3 (33,3%)	0/3(0%)
Adenoma tubulo-villosum	1/6 (16,7%)	6/6 (100%)	0/6(0%)
Polipus hyperplasticus	0/2 (0%)	1/2 (50%)	0/2(0%)
Colon carcinoma	1/1 (100%)	0 (0%)	0/1(0%)

DYSKUSJA

W badanej grupie chorych nie stwierdzono ani jednego przypadku zakażenia HPV-16/18. Podobny wynik uzyskali badacze z USA, którzy badali metodą PCR wycinki od 167 osób z polipami gruczołowymi i 87 z polipami hiperplastycznymi jelita grubego i w żadnym przypadku nie stwierdzili obecności onkogennych typów HPV (7). W innym badaniu, również przeprowadzonym w USA, nie stwierdzono korelacji między obecnością przeciwciał przeciw onkogennym typom HPV, a występowaniem polipów hiperplastycznych w grupie 97 mężczyzn z polipami jelita grubego i 184 zdrowych osób (8). W uzyskanych przez nas wynikach ciekawe jest stwierdzenie obecności HPV-6, a zwłaszcza HPV-11 u dużego odsetka badanych osób, odpowiednio 25% i 42%. Dotychczasowe dane dotyczące występowania nieonkogennych HPV w tkance jelitowej są bardzo skąpe. W naszym poprzednim, przeprowadzanym inną metodą badaniu DNA, HPV-6/11 wykryto w 24% badanych wycinków z polipów jelita grubego oraz w 27% wycinków ze zdrowej tkanki jelitowej ale materiały ze zdrowej tkanki pochodziły od tej samej grupy pacjentów z polipami (15). Badanie przeprowadzone w Arabii Saudyjskiej metodą Hybid Capture, dotyczące 53 pacjentów z polipami lub rakiem jelita grubego i 73 osób zdrowych lub ze stanem zapalnym jelit, wykazało obecność onkogennych lub nieonkogenych HPV u zaledwie 4 badanych osób (0,8%), bez istotnych różnic między grupą badaną a kontrolną (12). Ta rozbieżność wyników może wynikać z użycia różnych metod (HybidCapture, zwłaszcza w badaniach tkanek może charakteryzować się niższą czułością niż PCR) oraz z faktu badania różnych populacji, mogących mieć różną częstość występowania HPV. Obecność HPV-6 i HPV-11 w błonie śluzowej jelit mogłaby sugerować udział tych wirusów w patogenezie części przypadków polipów, jednak nie jest to związek oczywisty. W badaniu przeprowadzonym we Włoszech, dotyczącym 69 pacjentów z rakiem jelita grubego, obecność HPV stwierdzono w wycinkach u 16,9% chorych, z czego 63,6% stanowił HPV-16. Jednak równocześnie wykazano, że wirusowe DNA występowało wyłącznie w postaci episomalnej, nie zintegrowanej z DNA gospodarza. Taka forma zakażenia praktycznie świadczy o braku działania onkogennego w danym przypadku (14). Analogiczna sytuacja, występowania tylko DNA wirusa, ale nie jako czynnika wywołującego, mogła wystąpić w przypadku polipów i nieonkogennych HPV. Obecność HPV w złośliwych i łagodnych zmianach proliferacyjnych, może wiązać się ze zwiększoną podatnością na zakażenie tymi wirusami komórek które się dzielą, i nie musi oznaczać, że te wirusy są czynnikiem wywołującym. Istnieją jednak badania, których wyniki sugerują udział onkogennych HPV w niektórych przypadkach raka jelita grubego. Takie wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym w USA, w którym DNA HPV wykryto w 28 z 55 wycinków z raków jelita grubego (51%) i żadnym z 10 wycinków od osób zdrowych. Co więcej znacząca część HPV-dodatnich wycinków nie wykazywała ekspresji wirusowego genu E2, co świadczy o integracji materiału genetycznego wirusów z materiałem genetycznym gospodarza. W innym badaniu dotyczącym 57 pacjentów, w wycinkach z raka jelita grubego stwierdzono metodą PCR obecność DNA HPV w 15,8% próbek, a tylko w 8,8% w wycinkach ze zdrowych tkanek z otoczenia guza (17). W innym badaniu, w 11 (16%) z 69 zbadanych wycinków z raka jelita grubego, stwierdzono obecność HPV-16 metodą nested PCR. W 8 z tych 11 wycinków, stwierdzono ekspresję onkoproteiny E6 i inaktywację antyonkogenu p53 (10). Kolejne badanie dotyczyło 95 wycinków z raków jelita grubego, z których wykryto w 46 obecność

HPV, głównie HPV-16. Ponadto, w tkankach nowotworowych zakażonych HPV stwierdzono istotnie statystycznie większą aktywność czynnika transkrypcyjnego Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) oraz interleukiny 17, co jak sugerują autorzy, może być czynnikiem sprzyjającym rozwojowi raka jelita grubego (13). Metaanaliza dotycząca 37 różnych badań, łącznie obejmujących 2630 przypadków raka jelita grubego i 415 przypadków polipów, wykazała łącznie występowanie HPV odpowiednio w 11,2% raków i 5,1% polipów. W przypadku 8 badań, uwzględniających grupy kontrolne, ogółem HPV występowały w 36,8% przypadków raków jelita grubego i 1,6% grupy kontrolnej (1). Są to dane, które co prawda sugerują udział HPV w patogenezie raków i polipów jelita grubego, ale także w tym przypadku nie są one jednoznaczne.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że udział HPV w patogenezie niektórych przypadków polipów jelita grubego i ewentualna ich rola w transformacji nowotworowej polipów, pozostają kontrowersyjne i wymagają dalszych badań. Onkogenne HPV prawdopodobnie nie odgrywają roli w patogenezie polipów jelita grubego.

PIŚMIENNICTWO

1. *Baandrup L, Thomsen LT, Olesen TB* i inni. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. Eur J Cancer 2014; 50:1446-61.
2. *Bailie L, Loughrey MB, Coleman HG*. Lifestyle risk factors for serrated colorectal polyps: a systematic review and meta-analysis. Gastroenterology 2016; doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.003.
3. *Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY* i inni. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res 2005; 11: 2862-7.
4. *Brenner H, Kloor M, Pox CP*. Colorectal cancer. Lancet, 2014; 383, 1490–502.
5. *Bretthauer M, Kaminski MF, Løberg M* i inni. Population-based colonoscopy screening for colorectal cancer: a randomized clinical trial. JAMA Intern Med 2016; doi: 10.1001/jamainternmed.2016.0960.
6. *Bucchi D, Stracci F, Buonora N, Masanotti G*. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review. World J Gastroenterol 2016; 22: 7415-30.
7. *Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Mandelson MT* i inni. No evidence for human papillomavirus in the etiology of colorectal polyps. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2011; 20: 2288-97.
8. *Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Schwartz SM* i inni. No association between antibodies to sexually transmitted infections and colorectal hyperplastic polyps in men: Minnesota cancer prevention research unit polyp study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2012; 21: 1599-601.
9. *Chaturvedi AK*. Beyond cervical cancer: burden of other HPV related cancers among men and women. J Adolesc Health 2010; 46: S20-S6
10. *Chen TH, Huang CC, Yeh KT* i inni. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein associated with p53 inactivation in colorectal cancer. World J Gastroenterol 2012; 18: 4051-8.
11. *Ghadishah D, Brenner BE*. Candyloma acuminata. Medscape 2016; http://emedicine.medscape.com/article/781735-overview
12. *Gazzaz F, Mosli MH, Jawa H, Sibiany A*. Detection of human papillomavirus infection by molecular tests and its relation to colonic polyps and colorectal cancer. Saudi Med J 2016; 37: 256-61.
13. *Li YX, Zhang L, Simayi D* i inni. Human papillomavirus infection correlates with inflammatory Stat3 signaling activity and IL-17 level in patients with colorectal cancer. PLoS One 2015; 10: e0118391.

14. *Lorenzon L, Mazzetta F, Pilozzi E* i inni. Human papillomavirus does not have a causal role in colorectal carcinogenesis. World J Gastroenterol 2015; 21: 342-50.
15. *Młynarczyk B, Malejczyk M, Muszyński J, Majewski S.* The occurrence of human papillomavirus--HPV in the biopsies from colon polyps and cancer. Med Dośw Mikrobiol 2009; 61: 191-6.
16. *Shrubsole MJ, Wu H, Ness RM* i inni. Alcohol drinking, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. Am J Epidemiol 2008; 167: 1050–8.
17. *Tanzi E, Bianchi S, Frati ER* i inni. Human papillomavirus detection in paraffin-embedded colorectal cancer tissues.J Gen Virol 2015; 96: 206-9.
18. *Zur Hausen H.* Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 690-8.

Otrzymano: 17 XI 2016 r.
Adres Autora: 02-008 Warszawa, ul. Koszykowa 82a, Zakład Diagnostyki Chorób Przenoszonych Drogą Płciową Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2017, 69: 55 - 63

Występowanie zakażeń wywoływanych przez *Francisella tularensis* u ludzi w Polsce oraz laboratoryjna diagnostyka tularemii

The occurrence of infections caused by *Francisella tularensis* in humans in Poland and laboratory diagnosis of tularemia

Anna Chróst, *Kornelia Gielarowie*c, *Stanisław Kałużewski, Waldemar Rastawicki*

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Warszawa

Tularemia jest ostrą, odzwierzęcą chorobą zakaźną wywoływaną przez Gram-ujemne pałeczki *Francisella tularensis*. Ludzie zakażają się poprzez ukąszenia przez stawonogi, kontakt z tkankami chorych zwierząt, spożycie skażonej wody lub żywności jak też drogą aerogenną. Ze względu na wysoką zjadliwość i zakaźność, *F. tularensis* stanowi poważny czynnik zagrażający zdrowiu człowieka. Tularemia występuje częściej w rejonach o chłodniejszym klimacie, głównie na półkuli północnej, a dane uzyskane w ostatnich latach pokazują, że choroba ta stanowi w niektórych krajach poważny problem epidemiologiczny. Rozpoznanie tularemii stawiane jest na podstawie wywiadu lekarskiego, obrazu klinicznego oraz wyników badań serologicznych, genetycznych i hodowlanych. Celem prezentowanej pracy jest ocena występowania zakażeń wywoływanych przez pałeczki *Francisella tularensis* u ludzi w Polsce na tle innych krajów oraz charakterystyka laboratoryjnych metod diagnostyki tularemii.

Słowa kluczowe: *Francisella tularensis*, tularemia, sytuacja epidemiologiczna, diagnostyka

ABSTRACT

Tularemia is a serious infectious zoonotic disease, caused by Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. Natural reservoir of infection are small mammals such a mice, voles, squirrels and rabbits. Transmission to humans occurs through contact with infected animals or contaminated environments, or through arthropod vectors. Because of its extreme infectivity it is a dangerous biological agent to human health. Tularemia has a broad geographical distribution, however is mainly in the northern hemisphere, in areas with cooler climates particularly in North America, Europe, Russia and Japan. Most of the cases among European countries have been reported in the Scandinavian region. The prevalence rate of tularemia in Poland is small, although in recent years stable increase has been

observed. According to official epidemiological data during the years 2010-2016 only 61 cases of tularemia were reported in Poland. A laboratory diagnosis of tularemia is based on serological investigation, classical microbiology and molecular biology. The aim of this study was to evaluate the prevalence of infections caused by *Francisella tularensis* in humans in Poland and present characteristics of laboratory diagnosis of tularemia.

Keywords: *Francisella tularensis*, tularaemia, epidemiology, diagnostic methods

WSTĘP

Tularemia jest wysoce zakaźną, odzwierzęcą chorobą, zwaną także dżumą gryzoni, chorobą zajęczą bądź gorączką króliczą. Wywoływana jest przez Gram-ujemne, względnie tlenowe pałeczki *Francisella tularensis*, zaliczane do jednych z najbardziej zakaźnych bakterii. Dawka zakaźna dla człowieka wynosi od 5-50 komórek (7, 23, 28). W obrębie gatunku wyróżnia się dwa podgatunki: *F. tularensis subsp. tularensis* (typ A, wysoce zjadliwy) oraz *F. tularensis subsp. holarctica* (typ B, mniej zjadliwy) (21, 37). Rezerwuarem bakterii są małe gryzonie myszy, szczury, nornice, wiewiórki, zające, króliki, dzikie ptactwo oraz stawonogi, które pełnią również rolę wektora zakażenia, są to: kleszcze, muchy i komary z gatunku *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* (15, 33). Do zakażenia człowieka pałeczką tularemii dochodzi poprzez skórę, w wyniku ukłucia bądź przez kontakt bezpośredni z zakażonym zwierzęciem, rzadziej poprzez przewód pokarmowy i oddechowy. Wyróżnia się następujące postacie kliniczne choroby: wrzodziejąco-węzłową, oczno-węzłową, anginową, trzewną, duropodobną oraz płucną (36, 48). W Europie 95% przypadków stanowi postać wrzodziejąco-węzłowa, zwykle po ugryzieniu przez kleszcza lub po kontakcie z zakażonym zwierzęciem (23, 47). Okres wylęgania choroby jest bardzo krótki i wynosi zazwyczaj od 3 do 4 dni, ale w zależności od dawki zakażającej i zjadliwości zarazka może trwać dłużej (20, 24). Choroba może przybierać różne postacie, od ostrej poprzez łagodną a nawet bezobjawową. Typowy jest jednak nagły początek choroby z wysoką gorączką, dreszczami, bólami mięśni i ogólnym osłabieniem. Choroba nie przenosi się z człowieka na człowieka (11). Do grup ryzyka zalicza się rzeźników (oprawa mięsa), weterynarzy, myśliwych, leśników i rolników. Zwiększone ryzyko zakażenia występuje w miesiącach letnich, co jest związane z aktywnością kleszczy (42).

Tularemię znano od dawna w Japonii jako zwierzęcą chorobę pod nazwą yatopyo, natomiast w Ameryce Północnej jako gorączkę króliczą (rabbit fever). W 1907 roku amerykański okulista Martin opisał trzy przypadki zapalenia spojówek u osób mających zawodową styczność z dzikimi królikami. W 1911 roku McCoy badając w Kalifornii (hrabstwo Tulare) epizootię dżumy u gryzoni, stwierdził występowanie u wiewiórek bakterii, którym rok później, wraz Chapinem, nadał nazwę *Bacterium tularense* (20, 25, 48).

Pierwszy opis zakażenia człowieka tym zarazkiem podali w 1914 roku Wherry i Lamb, a dopiero w 1921 roku Edward Francis opisał siedem przypadków tej choroby u wieśniaków, w tym jeden śmiertelny. Ten sam badacz, szukając rezerwuaru zarazka, izolował bakterie od 17 zajęcy spośród 23 podejrzanych, jednocześnie podając metodykę hodowli (20).

W USA przypadki tularemii odnotowywane są regularnie, choć ich liczba od 1950 roku znacznie spadła, z poziomu około 700-800 przypadków rocznie, do około 100-150 przypadków i utrzymywała się mniej więcej na stałym poziomie w latach 1990-2010 (4, 5). Od 2010

roku liczba zachorowań stopniowo się zwiększa, osiągając zapadalność w 2015 roku 314 przypadków na 100.000 mieszkańców. Częściej tularemię stwierdzano u mężczyzn w średnim wieku, ale bardzo często zachorowalność dotyczyła także małych dzieci (19).

W Europie potwierdzone laboratoryjnie przypadki tularemii odnotowano po raz pierwszy w 1926 roku na terenach ZSRR. W późniejszych latach epidemie rozprzestrzeniły się na zachód i południe kontynentu. Pierwsze zachorowania opisano w Norwegii (1929 r.) i w Szwecji (1931 r.), a następnie w krajach Europy Środkowej – Austrii i Czechach (lata 1935-1937). Kolejna fala epidemii nastąpiła po II wojnie światowej w północnej części ZSRR, obejmując zachodnie tereny Europy, dotychczas wolne od tularemii (epidemie w NRD, RFN, Belgii i Francji). Największa liczba zachorowań w Europie przypada na lata 1930-1950, co było związane z utrzymywaniem się pałeczek tularemii wśród gryzoni i stawonogów, stanowiących naturalny rezerwuar zarazka (20, 40, 44).

Nowe przypadki zakażeń, w których stwierdzano inne źródło zakażenia niż zające, zaczęto odnotowywać w Turcji (1), Hiszpanii w 1997 r. (2), Niemczech w 2005 r. (16), Gruzji w 2006 r. (6), Włoszech w 1982 roku (14) oraz Bułgarii (8). W krajach tych, źródłem zakażenia często była skażona woda i żywność. W 2000 roku w Szwecji, na terenach gdzie wcześniej tularemia nie występowała endemicznie, w wyniku ukąszeń komarów zachorowało 270 osób (10).

W latach 2006-2012, w krajach Unii Europejskiej poziom zachorowalności na tularemię utrzymywał się mniej więcej na stałym poziomie, wynoszącym około 800-900 przypadków rocznie. Z tej liczby, ponad połowę stanowiły przypadki tularemii w Szwecji; wiele zakażeń odnotowywano także w Finlandii i Czechach. Po spadku liczby potwierdzonych przypadków tularemii w 2013 roku (309 przypadków), w 2014 roku odnotowano ogółem 526 przypadków, co daje średnią zapadalność na poziomie 0,11/100.000 mieszkańców (wzrost o 70% w porównaniu z rokiem 2013). W 2014 roku najwyższą zachorowalność na tularemię zanotowano pod koniec lata u mężczyzn w Szwecji, najczęściej po ukąszeniach przez kleszcze (12, 17, 27). Dane dotyczące zachorowalności na tularemię w Europie przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba oficjalnie zgłoszonych przypadków tularemii w Polsce w latach 2006-2014 w porównaniu z liczbą zgłoszonych przypadków w innych krajach europejskich (12).

Kraj/Lata	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Polska	0	1	0	1	4	6	6	8	11
Szwecja	241	174	382	244	484	350	590	108	150
Norwegia	11	49	66	13	33	180	50	28	46
Finlandia	475	403	116	405	91	75	233	15	9
Węgry	139	20	25	38	126	15	18	48	140
Czechy	79	51	109	64	50	57	42	36	48
Francja	24	48	104	16	22	16	5	21	57
Niemcy	1	20	15	10	31	17	21	20	21
Słowacja	49	11	25	22	17	5	8	9	6

W Polsce endemiczne ogniska tularemii występują głównie na północy i wschodzie kraju, w okolicach Białegostoku, Gdańska, Bydgoszczy i Szczecina. Pierwsze opisane przypadki pochodzą z 1931 roku. W 1949 roku w Łodzi po raz pierwszy wyizolowano pałeczkę tularemii. Pierwszą epidemię odnotowano w 1950 roku na terenie ówczesnego województwa

olsztyńskiego, gdzie rezerwuarem zarazka były prawdopodobnie zające. Kolejne zakażenia (4 przypadki) odnotowano w 1950 roku wśród pracowników Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie (20). W latach 1952/1953 na terenie województwa szczecińskiego wystąpiło kolejnych 70 zachorowań na tularemię, po kontakcie z zakażonym królikiem (26). Kolejne ognisko odnotowano w warszawskiej przetwórni dziczyzny, w której zachorowało 18 pracowników (22). W związku z powtarzającymi się zachorowaniami na tularemię podjęto badania epidemiologiczne głównie nad wykryciem rezerwuaru zarazka i jego przenosicieli. W latach 1949-2009 łącznie odnotowano 614 zachorowań na tularemię, w tym jeden przypadek śmiertelny w 1983 roku (23).

Grupą zawodową w wysokim stopniu narażoną na tularemię są pracownicy leśni. Przeprowadzone w 2006 roku badanie odczynem ELISA próbek surowicy uzyskanych od 480 pracowników leśnych z różnych regionów Polski wykazało obecność przeciwciał dla antygenów *F. tularensis* u kilku procent osób, częściej niż u krwiodawców zamieszkałych na terenie Warszawy (9, 35).

Zgodnie z ustawą o chorobach zakaźnych i zakażeniach (Dz.U. z 2013 r. poz. 947) w Polsce tularemia podlega rejestracji w Głównym Inspektoracie Sanitarnym. Co istotne, obowiązek zgłoszenia choroby zakaźnej spoczywa zarówno na lekarzu prowadzącym jak również na laboratorium, w którym uzyskano dodatni wynik badania w kierunku tularemii.

Tabela 2. Liczba oficjalnie zgłoszonych przypadków tularemii w Polsce w latach 2010-2016 w porównaniu do liczby osób z dodatnim wynikiem badań serologicznych w kierunku obecności przeciwciał dla antygenów *F. tularensis* przeprowadzonych w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH w Warszawie.

Lata	Liczba zgłoszonych przypadków tularemii w Polsce	Liczba osób, których surowice zbadano testami serologicznymi w kierunku tularemii w ZB NIZP-PZH	Liczba (odsetek) osób z dodatnim wynikiem badań serologicznych w kierunku tularemii w ZB NIZP-PZH
2010	4	4	-
2011	6	11	4 (36,4%)
2012	6	20	5 (25,0%)
2013	8	25	7 (28,0%)
2014	11	30	7 (23,3%)
2015	9	34	6 (17,6%)
2016	17	49	18 (36,7%)

Według oficjalnych danych zamieszczanych w biuletynie Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce, opracowywanym co roku przez Zakład Epidemiologii NIZP-PZH w Warszawie, w latach 2010-2016 zarejestrowano w Polsce 61 przypadków tularemii. W tabeli 2 przedstawiono liczbę oficjalnie zgłoszonych przypadków tej choroby w poszczególnych latach w całej Polsce oraz liczbę potwierdzonych metodami serologicznymi przypadków tularemii w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH. Na uwagę zasługuje stały wzrost w analizowanym okresie liczby osób podejrzanych w kierunku tularemii, od których przysłano do badania próbki surowicy. Pomimo tego, że w 2016 roku odnotowano w Polsce prawie dwukrotny wzrost liczby zgłoszonych przypadków tularemii w porównaniu do roku 2015 (z 9 do 17), w samym tylko Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w roku 2016

wykazano diagnostycznie znamienny poziom przeciwciał dla antygenów *F. tularensis* u 18 osób. Wszystkie rozpoznane przypadki zgłoszono, zgodnie z obowiązującym prawem, do Powiatowych Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych. Tak więc, mając na uwadze fakt, że laboratorium w NIZP-PZH jest tylko jednym z wielu wykonujących badania w kierunku tularemii w Polsce należy sądzić, że oficjalne dane dotyczące występowania tularemii w naszym kraju mogą być znacznie zaniżone. Może to być następstwem zarówno ograniczenia przez lekarzy pierwszego kontaktu zleceń badań laboratoryjnych w kierunku tularemii jak i niskiej zgłaszalności do Sanepidu rozpoznanych przypadków tej choroby.

Analiza poszczególnych przypadków tularemii w Polsce wykazała, że coraz częściej do zakażenia pałeczkami *F. tularensis* dochodzi w skutek ukąszenia przez owady i kleszcze, rzadziej poprzez kontakt z tkankami zajęcy i dzikich królików, a choroba przybiera postać wrzodziejąco-węzłową (13, 29, 48). Przypadki te są zbyt rzadko uwzględniane w laboratoryjnej diagnostyce w kierunku tularemii, co może być przyczyną niedoszacowania zachorowań na tularemię w Polsce. W związku z zaistniałą sytuacją epidemiologiczną należałoby uwzględnić diagnostykę różnicową zmian skórnych występującą po ugryzieniu przez stawonogi, szczególnie w przypadkach wrzodziejących i niegojących się ran obejmujących węzły chłonne (48).

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

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

Hodowla. Prowadzenie hodowli bakteryjnych dostarcza ważnych informacji dotyczących diagnozy zakażenia i jest nieocenionym źródłem informacji dla molekularnej epidemiologii, typowania i różnicowania podgatunków pałeczek *F. tularensis* (45). Do badań można pobierać plwocinę, wymazy z gardła, próbki materiału z przewodu pokarmowego, próbki ze zmian skórnych, aspiraty z węzłów oraz krew. Pałeczek tularemii nie udaje się wyhodować na powszechnie stosowanych podłożach, ponieważ do wzrostu wymagają związków zawierających grupy sulfhydrylowe (30). Do namnażania bakterii stosuje się podłoże agarowe z dodatkiem krwi, cysteiny i glukozy lub agar wzbogacony 9% ogrzewanymi erytrocytami barana i buforowany wyciągiem drożdżowym (CHAB). Wzrost bakterii na CHAB zapewnia wstępną identyfikację bakterii *F. tularensis.* Czas hodowli wynosi 24-48 godzin, ale w niektórych przypadkach kolonie mogą być widoczne dopiero po kilku dniach. Na podłożach stałych kolonie są gładkie, nieznacznie śluzowate, o wielkości 2-4 mm i barwie zielonkawo-białej. Na podłożach z krwią tworzą małą strefę hemolizy. Do hodowli *F. tularensis* z krwi rekomendowany jest system BACTEC (45). Trzeba mieć na uwadze, że hodowla pałeczek *F. tularensis* powinna być prowadzona w laboratorium o poziomie bezpieczeństwa 2 (BSL-2).

Metody genetyczne. W rutynowo prowadzonej molekularnej diagnostyce tularemii wykorzystuje się najczęściej łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) do poszukiwania w badanych próbkach materiału klinicznego obecności fragmentów genów *fopA* odpowiedzialnych za syntezę białek błony zewnętrznej i *tul4* kodujących wytwarzanie lipoproteiny błony zewnętrznej. W typowaniu molekularnym szczepów *F. tularensis* stosuje się

LR-REP-PCR (long range repetitive extragenic palindromic PCR), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intragenic consensus), INDEL (Insertion-Deletion), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) i SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (46). Wykorzystanie metod biologii molekularnej pozwala na typowanie różnych szczepów *F. tularensis*. Pomiędzy szczepami *F. tularensis subsp. tularensis* i *F. tularensis subsp. holarctica* wykazano różnicę w sekwencji 16S rRNA. Na tej podstawie opracowano metodę PCR, która odróżnia te dwa podgatunki (3). W identyfikacji *F. tularensis* zastosowano również metodę mikromacierzy DNA, która umożliwia uzyskanie dużej liczby informacji dotyczących ekspresji genów, mutacji, polimorfizmu czy stopnia pokrewieństwa (32).

Badania serologiczne. W laboratoryjnej diagnostyce tularemii najczęściej poszukuje się w badanych próbkach surowicy obecności swoistych przeciwciał dla pałeczek *F. tularensis*. Ze względu na fakt, że tularemia nie występuje powszechnie w populacji, a w czasie jej przebiegu stymulowany jest intensywnie układ odpornościowy do produkcji przeciwciał, badania serologiczne charakteryzują się bardzo wysoką czułością i swoistością. Przeciwciała dla antygenów *F. tularensis* pojawiają się we krwi zazwyczaj już po 10-14 dniach od początku objawów klinicznych, osiągając najwyższy poziom w 4-7 tygodniu choroby (34, 45). Pewnym problemem w interpretacji wyników badań serologicznych jest bardzo długo utrzymujący się podwyższony poziom przeciwciał zarówno klasy IgG jak i IgM (WHO). W Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH w rutynowej serodiagnostyce tularemii wykorzystuje się odczyn aglutynacji probówkowej oraz opracowany we własnym zakresie w 2005 roku odczyn ELISA (35). Na terenie kraju dostępny jest również komercyjny zestaw ELISA firmy Virion/Serion, służący do oznaczania w próbkach surowicy lub osoczu poziomu swoistych przeciwciał dla antygenów pałeczek *F. tularensis*. Przeprowadzone badania wykazały wysoką zgodność wyników uzyskanych zestawem ELISA firmy Virion/Serion, zestawem ELISA opracowanym w NIZP-PZH oraz odczynem aglutynacji probówkowej (36). Do poszukiwania swoistych przeciwciał dla pałeczek *F. tularensis* z dużym powodzeniem można stosować również odczyn lateksowy opracowany w NIZP-PZH (39).

KLASYFIKACJA PRZYPADKÓW I KRYTERIA ROZPOZNANIA TULAREMII

Zgodnie z definicją przyjętą do celów epidemiologicznych, za przypadek potwierdzony tularemii przyjmuję się osobę spełniającą kryteria kliniczne i laboratoryjne (18):

I. Kryteria kliniczne. Każda osoba, u której występuje co najmniej jedna z następujących postaci klinicznych:
   1. Postać wrzodziejąco-węzłowa tularemii:
      - owrzodzenie skóry oraz okoliczna limfadenopatia.
   2. Postać węzłowa tularemii:
      - powiększone i bolesne węzły chłonne, brak zmian skórnych.
   3. Postać oczno-węzłowa tularemii:
      - zapalenie spojówek oraz okoliczna limfadenopatia.
   4. Postać ustno-gardłowa tularemii:
      - limfadenopatia szyjna, oraz co najmniej jedno z następujących trzech kryteriów:
      - zapalenie jamy ustnej,
      - zapalenie gardła,
      - zapalenie migdałków.

5. Postać trzewna tularemii: co najmniej jedno z następujących trzech kryteriów:
   - ból brzucha,
   - wymioty,
   - biegunka.
6. Postać płucna tularemii:
   - zapalenie płuc.
7. Postać duropodobna tularemii: co najmniej jedno z następujących dwóch kryteriów:
   - gorączka, początkowo bez wyraźnej lokalizacji objawów,
   - posocznica.

II. Kryteria laboratoryjne. Co najmniej jedno z następujących trzech kryteriów:
   - izolacja *Francisella tularensis* z próbek materiału klinicznego,
   - wykrycie kwasu nukleinowego *Francisella tularensis* w materiale klinicznym,
   - wykazanie znamiennej dynamiki poziomu swoistych przeciwciał lub wykrycie ich na poziomie diagnostycznie znamiennym.

III. Kryteria epidemiologiczne. Co najmniej jedno z trzech powiązań epidemiologicznych:
   - narażenie przez to samo źródło,
   - przeniesienie ze zwierzęcia na człowieka,
   - narażenie przez skażoną żywność/wodę pitną.

PIŚMIENNICTWO

1. *Akalin H*, *Helvaci S*, *Gedikoglu S*. Re-emegrence of tularemia in Turkey. Int J Infect Dis 2009; 13: 547-51.
2. *Anda P*, *Segura del Pozo J*, *Garcija Diaz JM* i inni. Waterborne outbreake of tularemia associated with crayfish fishing. Emerg Infect Dis 2001; 7,5: 75-82.
3. *Berdal B.P*, *Mehl R*, *Meidell NK* i inni. Field investigations of tularemia in Norway. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 13: 191-5.
4. Center of Disease Control and Prevention. Tularemia - United States, 1990–2000. Morbidity and Mortality Weekly Report 2002; 51: 181-4.
5. Center of Disease Control and Prevention. Tularemia - United States, 2001–2010. Morbidity and Mortality Weekly Report 2013; 62: 963-6.
6. *Chitadze N*, *Kuchuloria T*, *Clark DV* i inni. Water-borne outbreak of oropharyngeal and glandular tularemia in Georgia: investigation and follow-up. Infection 2009; 37: 514-21.
7. *Chomiczewski K*. Patogeny zwierzęce jako broń biologiczna. Przegl Epid 2003; 57: 355-61.
8. *Christova I*, *Velinov T*, *Kantardjiev T* i inni. Tularaemia outbreak in Bulgaria. Scand J Dis Infect 2004; 36: 785-9.
9. *Cisak E*, *Wójcik-Fatla A*, *Zając V* i inni. Badania seroepidemiologiczne w kierunku *Francisella tularensis* wśród pracowników leśnictwa i rolników. MONZ 2014; 4: 412-4.
10. *Eliasson H*, *Lindback J*, *Pekka Nuorti J* i inni. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. Emerg Infect Dis 2002; 8: 956-60.
11. *Ellis J*, *Oyston PCF*, *Green M* i inni. Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 631-46.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2016. ECDC Sweden 2016. (http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/tularaemia/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx)
13. *Formińska K*, *Zasada AA*, *Rastawicki W* i inni. Increasing role of arthropod bites in tularaemia transmission in Poland – case reports and diagnostic methods. Ann Agric Environ Med 2015; 22: 443-6.

14. *Greco P*, *Allegini G*, *Tizzi T* i inni. A waterborne tularemia outbreak. Eur J Epidemiol 1987; 3: 35-8.
15. *Hanke CA*, *Otten JE*, *Berner R* i inni. Ulceroglandular tularemia in a toodler in Germany after a mosquito bite. Eur J Pediatr 2009; 168: 937-40.
16. *Hauri AM*, *Hofstetter I*, *Seibold E* i inni. Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. Emerg Infect Dis 2010; 16: 238-43.
17. *Hestvik G*, *Warns-Petit E*, *Smith LA* i inni. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. Epidemiol Infect 2015; 143: 2137-60.
18. http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_3.pdf
19. https://www.cdc.gov/tularemia/statistics/index.html
20. *Jakóbkiewicz J*. W: Ostre choroby zakaźne. Red. *S. Wszelaki*. Tom IV. PZWL, Warszawa 1954; 668-92.
21. *Keim P*, *Johansson A*, *Wagner DM*. Molecular epidemiology, evolution and ecology of *Francisella*. Ann N Y Acad Sci 2007; 1105: 30-66.
22. *Kicińska H*, *Kostrzewski J*, *Seibold E* i inni. Zachorowania na tularemię w Warszawie. Przegl Epidemiol 1954; 1: 37-42.
23. *Kłapeć T*, *Cholewa A*. Tularemia – wciąż groźna zoonoza. MONZ 2011; 3: 155-60.
24. *Lindgren H*, *Golovliov I*, *Baranov V* i inni. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. J Med microbiol 2004; 53: 953-8.
25. *Lipiński W*. Zarys kliniki chorób zakaźnych do użytku lekarzy i studentów. Tom II, Sekcja Wydawnicza Koła Medyków Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1948; 152-5.
26. *Malottke R*, *Dominowska Cz*. Zachorowania na tularemię w Polsce w latach 1946-1971. Przegl Epidemiol 1973; 59-63.
27. *Maurin M*, *Gyuranecz M*. Tularaemia: clinical aspect in Europe. Lancet Infect Dis 2016; 16: 113-24.
28. *Mierzyńska D*, *Hermanowska-Szpakowicz T*. Tularemia jako potencjalna broń bioterrorystów. Med Pr 2002; 53: 279-81.
29. *Moniuszko A*, *Zajkowska J*, *Pancewicz S* i inni. Arthroopod – borne tularemia in Poland: A case report. Vector-Borne Zoonot 2011; 11: 1399-401.
30. *Murray PR*, *Rosenthal KS*, *Pfaller MA* i inni. *Francisella* i *Brucella*. W: Mikrobiologia. Eds. Mosby Elsevier, Philadelphia, Pensylwania 2009; 347-53.
31. *Ohara Y*, *Sato T*, *Fujita H* i inni. Clinical manifestations of tularemia in Japan- analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987. Infection 1991; 19: 14-7.
32. *Osiak B*, *Bartoszcze M*, *Gaweł J*. *Francisella tularensis* – cechy zarazka, patogeneza, diagnostyka. Przegl Epidemiol 2006; 60: 601-8.
33. *Petersen JM*, *Mead PS*, *Schriefer ME*. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. Vet Res Commun. 2009; 40:7.
34. *Rastawicki W*, *Jagielski M*. Tularemia. Postęp Mikrobiol 2005; 44: 265-73.
35. *Rastawicki W*, *Kurowska J*, *Hermanowska-Szpakowicz T* i inni. Występowanie przeciwciał dla antygenów *Francisella tularensis* u pracowników leśnych w wybranych regionach Polski. Med. Dośw Mikrobiol 2006; 58: 207-15.
36. *Rastawicki W*, *Wolaniuk N*. Comparison of usefulness of commercial ELISA Virion/Serion, homemade ELISA and tube agglutination test in serodiagnosis of tularemia. Med. Dośw Mikrobiol 2013; 65: 255-61.
37. *Rastawicki W.* Tularemia. W: Choroby zakaźne I pasożytnicze – epidemiologia I profilaktyka. Red. A. Baumann-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, A. Zieliński. α- medica press, Bielsko-Biała 2014; 429-33.
38. *Rastawicki W*. Tularemia – niedoceniana choroba zakaźna. W: Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości. Red. *G. Bugla-Płoskońska*, *E. Lonc*. Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2015; 115-25.

39. *Rastawicki W*, *Rokosz-Chudziak N*, *Chróst A* i inni. Development and evaluation of a latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of tularemia. J Microbiol Meth 2015; 112: 1-2.
40. *Serokowa D*. Tularemia. W: Choroby zakaźne w Polsce i ich zwalczanie w latach 1919 – 1962. Red. *J. Kostrzewski*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1964; 352-6.
41. *Sobolewska-Pilarczyk M*, *Pawłowska M*, *Halota W*. Ulceroglandular tularemia complicated by pneumonia – a case report. Przegl Epidemiol 2014; 68: 421-4.
42. *Tarnvik A*, *Sandstrom G*, *Sjostedt A*. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden, 1931-1993. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 13: 201-4.
43. *Tarnvik A*, *Berglund L*. Tularaemia. Eur Respir J 2003; 21: 361-73.
44. *Weiner M*, *Kubajka M*. Tularemia – serious zoonotic disease. Health problems of civilization 2015; 1: 39-46.
45. Word Heath Organization. WHO Guidelines on Tularemia. Geneva: WHO Press, 2007 (http://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf).
46. *Xin-He L*, *Long-Fei Z* i inni. Rapid Identification and Characterization of *Francisella* by Molecular Biology and Other Techniques. TOMICROJ 2016; 10: 64-77.
47. *Yanushevych M*, *Komorowska-Piotrowska A*, *Feleszko W*. Tularemia – choroba zapomniana? Doświadczenia własne. Dev Period Med 2013; 17: 355-9.
48. *Zabłocki B*. Bakterie i wirusy chorobotwórcze człowieka. PWN, Warszawa 1966; 292-6.

Otrzymano: 10 I 2017 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
Zarząd Główny
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa
NIP 521-11-21-855

Warszawa, 17.03.2017 r.

Szanowni Mikrobiolodzy i wszyscy Państwo zainteresowani badaniami mikrobiologicznymi w Polsce

We wrześniu ub. roku ukonstytuowało się nowe Prezydium Zarządu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (PTM). Głównym celem naszego Stowarzyszenia jest propagowanie rozwoju nauk mikrobiologicznych i popularyzowanie osiągnięć mikrobiologii wśród członków PTM oraz szerokich kręgów społeczeństwa.

Zarząd PTM stara się zaprosić do współpracy i zjednoczyć w ramach Towarzystwa wszystkie osoby wnoszące istotny wkład w rozwój rozmaitych gałęzi mikrobiologii: klinicznej, weterynaryjnej, środowiskowej, przemysłowej, farmaceutycznej, mikrobiologii żywności, wody, osoby prowadzące badania podstawowe, rozwojowe, przeglądowe, kontrolne, genetyczne i inne.

Wiele jest zagadnień wymagających wnikliwych badań i oceny przez mikrobiologów, np.: problem narastającej lekooporności drobnoustrojów zwłaszcza chorobotwórczych, mikrobiologiczne zanieczyszczenie środowiska, GMO, poprawa systemu jakości i metod kontroli żywności, kosmetyków, leków, wyrobów medycznych i produktów biobójczych. Do realizacji tych planów konieczna jest szeroka współpraca nie tylko mikrobiologów: naukowców, nauczycieli akademickich, lekarzy, specjalistów pracujących w przemyśle, rolnictwie, wykonujących mikrobiologiczne badania kontroli w rozmaitych obszarach, ale także firm diagnostycznych, farmaceutycznych, kosmetycznych, produkujących żywność, środki przeciwdrobnoustrojowe, odczynniki oraz aparaturę kontrolną i badawczą.

W 2017 r. z okazji 90-lecia działalności Towarzystwa planujemy zorganizować Konferencję „90 lat PTM wczoraj – dziś – jutro", która odbędzie się w dniach 22-23 września w Krakowie i jak zakładamy zgromadzi kilkaset osób związanych z mikrobiologią.

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

W związku z tak szeroką działalnością, zwracamy się do Państwa z prośbą o wsparcie naszego Towarzystwa poprzez:

- darowizny na cele statutowe
- udział w Konferencji z okazji 90-lecia Towarzystwa. Planujemy w trakcie jej trwania udostępnienie powierzchni na organizację stoisk firm, pragnących reklamować swoje produkty.
- przystąpienia do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów jako **członek wspierający PTM**. Prezydium PTM podjęło decyzję o minimalnej wysokości składki rocznej członka wspierającego:

Członek Zwyczajny – 3.000 zł; Członek Srebrny – 5.000 zł; Członek Złoty – 10.000 zł

Członkowie wspierający (informacje o nich: nazwa firmy, logo i adres) uzyskują następujące przywileje:

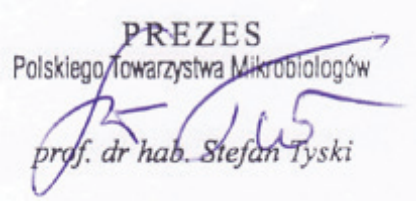
* wszyscy wymienieni są na stronie PTM, na facebooku oraz w każdym numerze 3 czasopism – kwartalników PTM: Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology, w danym roku;.
* wszyscy wymienieni są w materiałach konferencji organizowanych i współorganizowanych przez PTM. Możliwe jest dołączenie materiałów informacyjnych firm do materiałów konferencyjnych;
* wszyscy otrzymują w danym roku wszystkie numery 3 czasopism (łącznie 12 numerów - zeszytów);
* otrzymują zniżki 15% (**Członek Srebrny**) 25% (**Członek Złoty**) na stoisko, jeżeli takie będą na konferencjach organizowanych przez PTM;
* możliwe jest nieodpłatne umieszczanie reklam czarno-białych i kolorowych z 50% zniżką, w kwartalnikach: Postępy Mikrobiologii oraz Polish Journal of Microbiology (oba czasopisma z IF):

Członek Srebrny - 1 reklama całostronicowa lub 2 reklamy po pół strony raz w roku, w jednym numerze jednego z w/w wymienionych czasopism

Członek Złoty - 2 reklamy całostronicowe lub 3 reklamy po pół strony raz w roku, w jednym numerze, obu w/w wymienionych czasopism.

Niniejszy list jest informacją i jednocześnie prośbą o współpracę z Towarzystwem.

W przypadku Państwa zainteresowania, możliwości udziału Państwa firmy w działalności PTM będziemy omawiać bezpośrednio (ptm.zmf@wum.edu.pl)



Szanowni Mikrobiolodzy,
Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
i wszyscy Państwo zainteresowani badaniami mikrobiologicznymi w Polsce

Bardzo zapraszamy do współpracy z PTM i zostania członkiem naszego Stowarzyszenia. Staramy się upowszechnić i uatrakcyjnić informacje o Polskim Towarzystwie Mikrobiologów. Uruchomiliśmy konto PTM na facebooku, opracowaliśmy również nową stronę internetową PTM: www.microbiology.pl.

Prosimy osoby zainteresowane pewnymi obszarami mikrobiologii o włączenie się w działalność sekcji PTM, które chcielibyśmy uruchomić **(Struktura > Sekcje).** Od szeregu lat pojawiały się postulaty o stworzenia takiego forum.

Prosimy o zwrócenie uwagi na konferencje krajowe i zagraniczne oraz szkolenia **(Konferencje i szkolenia mikrobiologiczne)**. Na stronie internetowej chcemy umieszczać wszystkie informacje dotyczące powyższej działalności, zwłaszcza o krajowych konferencjach organizowanych i współorganizowanych przez Oddziały Terenowe PTM oraz planowanych pod patronatem PTM, a także innych konferencjach mikrobiologicznych niezwiązanych z PTM.

Dział **(Współpraca zagraniczna)** zawiera podstawowe informacje o dużych mikrobiologicznych organizacjach światowych, natomiast w **części (Nagrody i stypendia)** sygnalizujemy możliwości stypendialne FEMS i informacje o innych wyróżnieniach, które mogą otrzymać członkowie PTM.

Każdy Oddział Terenowy PTM będzie mógł zamieścić informacje o swojej historii, dokonaniach, działalności, planach, konferencjach itp. **(Oddziały Terenowe PTM)**.

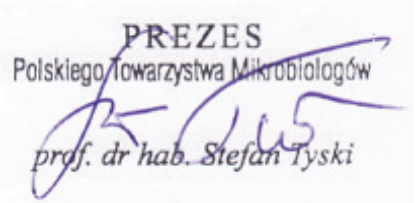
Bardzo zależy nam na nowych członkach zwyczajnych, ale również członkach wspierających PTM, przede wszystkim organizacjach i firmach działających w obszarze mikrobiologii **(Członkowie > Członkowie wspierający)**.

Dużą uwagę przywiązujemy do historii mikrobiologii, zwłaszcza historii PTM i wkładu Polaków w mikrobiologię światowa i krajową **(Historia)**.

Tworzone są nowe strony internetowe czasopism PTM z bezpośrednim dostępem z niniejszej strony, co ma ułatwić informację o publikacjach i zwiększyć ich cytowalność **(Wydawnictwa PTM)**.

Bardzo prosimy o nadsyłanie uwag, co do zawartości i wyglądu nowej strony PTM, a także podawanie informacji dodatkowych, które uważacie Państwo, że powinny dotrzeć do szerokiego gremium członków naszego Stowarzyszenia. (ptm.zmf@wum.edu.pl).

Strona będzie poprawiana i aktualizowana na bieżąco, tak, aby stać się możliwie dobrą, atrakcyjną wizytówką Polskiego Towarzyswa Mikrobiologów.



Informacja o składkach członkowskich PTM w 2017 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów uprzejmie informuje, iż wysokość składki członka zwyczajnego PTM w roku 2017 wynosi 100 zł/rok. Wysokość składki dla emerytowanych członków zwyczajnych PTM wynosi 50 zł/rok.

W przypadku zmiany danych wcześniej przekazanych do ZG PTM (np. zmiana miejsca pracy, adresu, e-maila, przejście na emeryturę itp.), prosimy o aktualizację i wypełnienie „Formularza aktualizacji danych osobowych" (dostępny na stronie PTM). Z opłacania składki członkowskiej zwolnieni są członkowie honorowi Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

SKŁADKI PROSIMY OPŁACAĆ DO KOŃCA I KWARTAŁU KAŻDEGO ROKU KALENDARZOWEGO.

Statut PTM § 14 ust 3. „Członek zwyczajny jest zobowiązany do regularnego opłacania składki członkowskiej w wysokości ustalonej przez Walne Zgromadzenie Delegatów Towarzystwa".

Statut PTM § 15 ust 3. „ Członkostwo zwyczajne ustaje na skutek skreślenia z listy członków Towarzystwa z powodu niezapłacenia składki członkowskiej przez dwa kolejne lata……..."

W związku z porządkowaniem listy członków zwyczajnych PTM, osoby, które nie zapłaciły składki za lata 2015, 2016 uprzejmie są proszone o uregulowanie tych składek.

Osoby, które nie opłaciły składek za lata 2014, 2013 i wcześniejsze, proszone są o uregulowanie tych składek (można to uczynić w miesięcznych ratach w ciągu I półrocza 2017 r.), a w przypadku nie uregulowania składek do 30.06.2017 r. osoby te zostaną skreślone z listy członków zwyczajnych PTM. W przypadku, gdy dysponujemy aktualnym adresem, osoby te zostaną wcześniej powiadomione listem wysłanym z Oddziału Terenowego PTM, o możliwości skreślenia ich z listy członków PTM w sytuacji nie uregulowania zaległych składek PTM do dnia 30.06.2017 r.

Jednocześnie informujemy, że tylko członkowie z opłaconą składką za dany rok otrzymają nieodpłatnie kwartalnik Postępy Mikrobiologii lub Polish Journal of Microbiology (prosimy o podanie wybranego czasopisma przy opłacaniu składki członkowskiej). W przypadku braku deklaracji przesyłany będzie kwartalnik Postępy Mikrobiologii. Istnieje możliwość rocznej prenumeraty drugiego kwartalnika koszt - 40 zł/rok (dla członków PTM).

Również tylko członkowie z opłaconą składką za dany rok mogą starać się o stypendia FEMS, niższe opłaty wpisowe na konferencje współorganizowane przez PTM oraz występować jako osoby rekomendujące: kandydatów na nowych członków PTM oraz kandydatów na stypendia FEMS.

NUMER KONTA

Składki członkowskie należy wpłacać na konto:
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa
Bank: BGŻ BNP Paribas, nr konta: 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550

Na przekazie prosimy umieścić informacje:
imię, nazwisko, oddział PTM, rok za który dokonywana jest opłata składki.

Otrzymaliśmy kilkanaście wpłat składek, bez określenia, kto i za jaki rok wnosi opłatę.

BIURO Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa WUM Budynek CePT, tel: 22 116 61 77,
fax: 22 116 61 96, e-mail ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl
https://www.facebook.com/Polskie-Towarzystwo-Mikrobiolog%C3%B3w-246114759137556/

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY
POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Członek Złoty Wspierający PTM - od 27.03.2017 r.

HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions,
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k/ Krakowa
tel: (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl; NIP 675-12-63-252
Dyrektor Generalny: Mateusz Jurczyk

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

INFORMACJA O KONFERENCJACH WSPÓŁORGANIZOWANYCH PRZEZ POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW ORAZ Z PATRONATEM PTM W 2017 r.

Konferencja Naukowa
90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów,
PTM wczoraj – dziś – jutro
Kraków, 22-23 września 2017 r.

Komunikat II

Komitet Organizacyjny Konferencji Naukowej Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów zaprasza członków PTM szczególnie biorących udział w Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM oraz sympatyków Towarzystwa do uczestnictwa w Konferencji organizowanej w dniach 22-23 września w Krakowie.

Celem Konferencji będzie pogłębienie wiedzy w dziedzinie mikrobiologii, wprowadzenie zmian w statucie PTM, a także przypomnienie dorobku naukowego prof. Odona Bujwida w 160 rocznicę urodzin przypadającą w 90-tą rocznicę powołania Towarzystwa.

Program naukowy konferencji obejmuje serię wykładów i sesje plakatowe.
Wykłady naukowe zaprezentują specjaliści z następujących dyscyplin mikrobiologii:

prof. Dariusz Bartosik, genetyka bakterii;
prof. Marian Binek, mikrobiologia weterynaryjna;
prof. Katarzyna Czaczyk, mikrobiologia żywności;
prof. Beata Gutarowska, mikrobiologia techniczna;
prof. Waleria Hryniewicz, bakteriologia lekarska;
prof. Zofia Piotrowska-Seget , biotechnologia środowisk;
prof. Krzysztof Pyrć, wirusologia;
prof. Ewa Swoboda-Kopeć, mykologia.

Prezentacje o charakterze historycznym dotyczące prof. Odona Bujwida oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów przedstawią:

prof. Małgorzata Bulanda
prof. Jacek Międzobrodzki
prof. Stefan Tyski

Zapraszamy uczestników Konferencji, zwłaszcza delegatów PTM, do zgłaszania doniesień naukowych w formie plakatów, których streszczenia zostaną opublikowane w materiałach konferencyjnych (maksymalnie 2 streszczenia/osobę). Precyzyjne informacje dotyczące szczegółów przygotowania streszczeń i prezentacji plakatowych zamieszczone są na stronie internetowej konferencji: www.microbiology.pl.

Informacja o rekomendowanych hotelach i domach akademickich zlokalizowanych w bliskiej odległości od miejsca obrad znajdzie się na stronie konferencji.

Osoby zainteresowane uczestnictwem w Konferencji informujemy o ważnych terminach:

- Termin nadsyłania streszczeń plakatów: 2 czerwca 2017 r. (pierwotnie planowano 01.05.2017 r.).
- Termin powiadomienia autorów o akceptacji streszczenia doniesienia plakatowego: 15 czerwca 2017 r. (pierwotnie planowano 21.05.2017 r.).
- Konferencja rozpoczyna się w piątek 22 września 2017 r. w Auditorium Maximum UJ, ul. Krupnicza 33, Kraków.
- Rejestracja uczestników 22 września od godziny 16.00.
- Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów PTM 23 września 15.00-19.00.
- Zakończenie konferencji 23 września godz. 22.00.

Opłaty konferencyjne:

- Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) członkowie PTM
  terminie do 30 czerwca 2017r.: 100 PLN;
  w terminie po 30 czerwca 150 PLN.
- Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) nie będący członkami PTM – udział czynny
  w terminie do 30 czerwca 2017r.: 200 PLN;
  w terminie po 30 czerwca 250 PLN.
- Członkowie PTM
  w terminie do 30 czerwca 2017 r.: 300 PLN;
  w terminie po 30 czerwca 400 PLN.
- Osoby nie będące członkami PTM
  w terminie do 30 czerwca 2017r.: 400 PLN;
  w terminie po 30 czerwca 500 PLN.

Informacje dotyczące pozostałych spraw organizacyjnych można uzyskać pod adresem: zjazdptm@cbm.com.pl lub pod telefonem +48 665 355 255.

Serdecznie zapraszamy Państwa do przyjazdu do Krakowa i aktywnego udziału w Konferencji.

Komitet Organizacyjny
Konferencji Naukowej
„PTM wczoraj – dziś – jutro”
Kraków 22-23 września 2017 r.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

VI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa

MIKROBIOLOGIA FARMACEUTYCZNA 2017

Gdańsk 31.05-2.06.2017

Komunikat II

Z prawdziwą przyjemnością zapraszamy do udziału w VI konferencji naukowo-szkoleniowej: **Mikrobiologia Farmaceutyczna 2017**, która odbędzie się w dniach 31.05-2.06 br. w Gdańsku. Tym razem zorganizowana zostanie przez **Polskie Towarzystwo Mikrobiologów** i **TRANSpharmacia.** Z dużą przyjemnością informujemy także, iż w ramach **PTM** powstaje długo oczekiwana przez nas sekcja **Mikrobiologia Farmaceutyczna.**

Nasza konferencja jest kontynuacją rozpoczętego w 2009 roku cyklu spotkań naukowo-szkoleniowych, którego celem jest stworzenie **Forum** specjalistów zainteresowanych mikrobiologią farmaceutyczną, umożliwiającego wymianę wiedzy, poglądów i doświadczeń w obszarach oceny i zapewnienia jakości, badań mikrobiologicznych oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów leczniczych.

Podczas naszego spotkania przedstawimy szereg zagadnień istotnych dla Mikrobiologów pracujących w wytwórniach farmaceutycznych, laboratoriach mikrobiologicznych współpracujących z przemysłem farmaceutycznym, wydziałach farmaceutycznych uczelni, a także dla Osób Wykwalifikowanych, Specjalistów Zapewnienia i Kontroli Jakości, Audytorów oraz Osób odpowiedzialnych za współpracę z kontraktowymi laboratoriami mikrobiologicznymi.

Podczas konferencji tradycyjnie już przedstawimy aktualne i planowane zmiany w przepisach i wymaganiach farmakopealnych.

Tym razem dużo miejsca poświęcimy Laboratorium mikrobiologicznemu, jego roli w wytwórni, szkoleniom dla pracowników kluczowych, nie będących mikrobiologami. Przyjrzymy się również zagadnieniom istotnym w badaniach mikrobiologicznych i postępowaniu z wynikami. Zajmiemy się także jakością mikrobiologiczną produktów leczniczych i wyrobów medycznych obecnych na rynku.

Zastanowimy się także nad zakresem i sposobem przekazywania wiedzy mikrobiologicznej pracownikom Wytwórni Farmaceutycznych.

Kontynuujemy zapoczątkowaną na V Konferencji sesję pytań i odpowiedzi czyli dyskusję na tematy i omówienie problemów zgłoszonych wcześniej przez uczestników. Tematy można zgłaszać do 15 kwietnia.

Przewidujemy również stoiska wystawiennicze firm współpracujących z laboratoriami mikrobiologicznymi

A zatem czekamy na spotkanie z Państwem na szóstej konferencji naukowo-szkoleniowej **Mikrobiologia Farmaceutyczna 2017.** Pełna informacja i formularz zgłoszenia są dostępne na stronach: Transpharmacia: **http://www.transpharmacia.pl/** w zakładce szkolenia Polskie Towarzystwo Mikrobiologiczne: **http://www.microbiology.pl/**

W imieniu organizatorów z poważaniem

Barbara Kawałko-Myślińska
Biuro Organizacji Konferencji

Prof. dr hab. Stefan Tyski
Przewodniczący Rady Naukowo-Programowej

Rada Naukowo-Programowa

1. **prof. dr hab. Stefan Tyski–przewodniczący**
2. **mgr Barbara Kawałko-Myślińska**
3. **mgr Krystyna Mysłowska**
4. **dr Tomasz Zaręba**

Wykładowcy

mgr Katarzyna Bucała-Śladowska (CBMiA)
mgr Marta Adamkiewicz-Alejziak (Medana Pharma)
mgr Michał Iwaniec (DataComplex)
dr Rafał Hałasa (Gdański Uniwersytet Medyczny)
dr Anne-Grit Klees (Merck)
dr Agnieszka Konopacka (Gdański Uniwersytet Medyczny)
mgr Karina Malczewska-Chaładaj (Medana Pharma)
dr Jadwiga Marczewska (niezależny konsultant))
dr Małgorzata Młynarczyk (Biomed Warszawa)
mgr Konrad Mysiakowski (Galena)
mgr Krystyna Myslowska (niezależny konsultant)
dr inż. Dorota Nowak-Ziatyk (BioMaxima SA)
mgr Danuta Ostrowska (GSK)
dr Rafał Pokrowiecki (Uniwersytet Medyczny Olsztyn)
mgr Mirosław Popieluch (DataComplex)
mgr Izabela Rogala (Medana Pharma)
prof. dr hab.. Małgorzata Sznitowska (Gdański Uniwersytet Medyczny)
dr Katarzyna Turecka (Gdański Uniwersytet Medyczny)
prof. dr hab. Stefan Tyski (Narodowy Instytut Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny)
dr Tomasz Zaręba (Narodowy Instytut Leków)
mgr Anna Zawistowska-Rojek (Narodowy Instytut Leków, Warszawski Uniwersytet Medyczny)

Miejsce

Gdańsk – Hotel Mercure Gdańsk Posejdon, ul. Kapliczna 30

Planowany Program Konferencji

1. Co nowego w Farmakopei
2. Nowe antybiotyki w badaniach klinicznych Udział Laboratorium Mikrobiologicznego w walidacjach procesowych, walidacji mycia i czyszczenia, kwalifikacji czystych pomieszczeń i walidacji systemów wodnych
3. Wskaźniki biologiczne – nowe podejście do kontroli sterylizacji
4. Kontrola pożywek w laboratorium
5. Aspekty mikrobiologiczne podczas zwalniania serii
6. Szkolenia – edukacja mikrobiologiczna kluczowych pracownikom wytwórni farmaceutycznej (nie mikrobiologów)
7. Konserwanty – analiza skuteczności biobójczej, optymalizacja doboru związków

8. Jakość, świadomość, współpraca - efektywne kształtowanie indywidualnej odpowiedzialności
9. Badania mikrobiologiczne probiotyków
10. Jak analizować trendy zgodnie z wytycznymi i poprawnie statystycznie
11. Badania mikrobiologiczne próbek wody z rzeki Wisły w okolicach Warszawy
12. Badania implantów stomatologicznych pod kątem tworzenia biofilmu
13. Dystrybucja międzyfazowa środków konserwujących w dyspersjach
14. Częstotliwość badań mikrobiologicznych monitoringu środowiska dla produkcji – analiza ryzyka
15. Proces zarządzania i organizacji pracy w laboratorium mikrobiologicznym
16. Organizacja-optymalizacja pracy w laboratorium mikrobiologicznym
17. Kontrola mikrobiologiczna kosmetyków, w procesie wytwarzania oraz ocena poziomu ochrony produktu przed wtórnymi zakażeniami-test konserwacji
18. Skuteczność środków neutralizujących środki dezynfekcyjne
19. Zastosowanie technologii Biolog do identyfikacji mikroorganizmów

---

ZGŁOSZENIE UCZESTNICTWA

Proszę wysłać faxem (**223983948**) lub e-mailem na adres **transpharmacia@transpharmacia.pl**

Lp.	Imię i nazwisko uczestnika (litery drukowane)	Tylko opłata konferencyjna	Nocleg 31.05-2.06 (dwa noclegi)	
			Dwu osobowy	**Jedno Osobowy**
1.				
2.				
3.				

Osoba zgłaszająca:

Imię nazwisko	e-mail	Telefon kontakt.

Dane do faktury VAT.

Pełna nazwa firmy	
Adres	
Kod pocztowy, miejscowość	
NIP	

	Rejestracja do 8.04.2017	Rejestracja po 8.04.2017
Koszt uczestnictwa bez noclegu	1320,00 zł + VAT	1450,00 + VAT
Uczestnictwo i nocleg w pokoju dwuosobowym	1640,00 zł + VAT	1760,00 + VAT
Uczestnictwo i nocleg w pokoju jedno - osobowym	1890,00 zł+ VAT	1990,00 + VAT

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów - 100,-zł zniżki
Druga osoba z tej samej firmy 10 % zniżki (od opłaty podstawowej)
Trzecia osoba i więcej z tej samej firmy 20% zniżki (od opłaty podstawowej)
2**. Opłata obejmuje**: - udział w konferencji, wyżywienie podczas konferencji,
- materiały konferencyjne (wersja papierowa i elektroniczna)
Sposób płatności:
Przelew: Transpharmacia - Millenium 57 1160 2202 0000 0001 1196 1446

Warunki rezygnacji (forma pisemna)

do 5 dni rob. przed szkoleniem	Poniżej 5 dni	nie zgłoszenie się na szkolenie bez uprzedzenia
Bez opłat	40 % opłaty	100% opłaty –pełny koszt

3. **Biuro organizacji konferencji**: TRANSpharmacia
Barbara Kawałko – Myślińska **transpharmacia@transpharmacia.pl;** tel **+48 601382182**

KONFERENCJA BIOMILLENIUM 2017
„Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii"
Gdańsk, 6-8 września 2017 r.
Komunikat I

Szanowni Państwo,
W imieniu Komitetu Organizacyjnego mamy zaszczyt zaprosić Państwa do udziału w **Konferencji BioMillenium 2017 – „Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii", która odbędzie się w dniach 6-8 września 2017 na terenie Politechniki Gdańskiej w Gdańsku.**
Głównym organizatorem Konferencji jest Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Współorganizatorami są również Katedra Mikrobiologii i Katedra Immunologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego oraz Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Chorób Zakaźnych.
Prezentowane zagadnienia będą podzielone na pięć tematycznych sesji: Biotechnologia: w medycynie, w przemyśle, w ochronie środowiska, Mikrobiologia: kliniczna oraz molekularna**.**

Konferencja rozpocznie się wykładem przedstawiającym sylwetkę, zainteresowania i osiągnięcia naukowe zmarłego w tym roku Pana Prof. dr hab. Józefa Kura, założyciela Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz naukowca, który swoimi pracami nie tylko wiele wniósł wiele do mikrobiologii i biotechnologii, ale był ich wielkim popularyzatorem.
Przewidujemy wykłady plenarne, prezentacje ustne, sesję plakatową oraz warsztaty praktyczne prowadzone przez firmy. Mamy nadzieję, że prezentacje wyników Państwa badań naukowych pokażą, że biotechnologia nie jest wciąż dziedziną „nauki przyszłości", ale już dziś przyniosła rozwiązania stosowane w wielu gałęziach przemysłu i w medycynie oraz że mikrobiologia nie jest „skostniałą dziedziną", ale obszarem nauki, w którym zarówno tworzy się, jak i wykorzystuje nowoczesne technologie.
Wierzymy, że Konferencja będzie okazją do nawiązania kontaktów umożliwiających efektywną współpracę.
Wszystkim, którzy wezmą udział w Konferencji, życzymy miłego pobytu w Gdańsku. Szczegółowy program i informacje zostaną przesłane w następnym komunikacie.
Organizatorzy Konferencji BioMillenium 2017
Kontakt: 583472417- sekretariat oraz 583472383; 583476412; 583472406; 583472302

Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska
- MIKROBIOT 2017,
Łódź, 19-21 września 2017 r.

"**Microbiology in Health Care and Environmental Protection" - MIKROBIOT 2017, Lódź, Poland, September 19-21, 2017**.

Komunikat I

W imieniu Organizatorów, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów mamy przyjemność serdecznie Państwa zaprosić do wzięcia udziału w **IV edycji konferencji naukowej „Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska" - MIKROBIOT 2017**, która odbędzie się **w Łodzi w dniach 19-21 września 2017 r.**

On behalf of the Organizing Committee, The Institute of Microbiology, Immunology and Biotechnology at the University of Lodz in Poland, together with Polish Society of Microbiologists, it is our great honor and pleasure to invite you to attend the 4th edition of scientific conference "**Microbiology in Health Care and Environmental Protection" - MIKROBIOT 2017**. This event will take place **in Lodz, Poland, September 19-21, 2017**.

The goal of the meeting is to provide opportunities for exchange ideas and research experience in the fields of microbiology, immunology and biotechnology, including microbial virulence factors, human immune response to infections, epidemiology, structure and physiology of environmental microorganisms, their use in biotechnological processes and in the removal of environmental pollution, as well as the role of microorganisms in their habitats and their relationships with other organisms.

As in the previous edition of the conference MIKROBIOT, which enjoyed great interest of the scientific community from all over Poland and met with appreciation from foreign visitors, during the upcoming 4th edition of MIKROBIOT 2017 plenary lectures will be given by eminent scientists, among others from Germany, Portugal, France or Italy. The official conference language will be English. During the conference MIKROBIOT 2017 four scientific sessions are provided for:

1. Clinical microbiology and immunology
2. Microbial biotechnology
3. General and environmental microbiology
4. Genetics and genomics of microbes

Konferencja pod patronatem PTM

JUVENES PRO MEDICINA 2017, 55 KONFERENCJA OGÓLNOPOLSKA I 13 KONFERENCJA MIĘDZYNARODOWA STUDENCKIEGO TOWARZYSTWA NAUKOWEGO UMIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

Łódź, 19-20 maja 2017

Juvenes Pro Medicina jest jedną z największych konferencji naukowo-szkoleniowych, odbywających się w centralnej Polsce. Konferencja ta odbywa się każdego roku od ponad 50 lat (pierwsza edycja konferencji miała miejsce w 1962 roku). Jest organizowana przez Studenckie Towarzystwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
Nieodłącznym elementem konferencji Juvenes Pro Medicina są warsztaty seminaria i wykłady, kierowane do uczestników konferencji i wszystkich zainteresowanych. Zajęcia prowadzone są przez wykładowców naszej Uczelni oraz przez zagranicznych gości. Tematyka warsztatów/seminariów jest bardzo zróżnicowana – obejmuje zagadnienia medyczne, szkolenia z zakresu umiejętności społecznych, biostatystyki, warsztatów językowych. W poprzedniej edycji zainteresowani mogli wybrać spośród 10 rodzajów zajęć. Do tej pory sesja Basic Science, na której prezentowane są liczne prace m.in. z mikrobiologii, cieszyła się dużym zainteresowaniem uczestników, a znaczna część prezentowanych prac

zaowocowała publikacjami w istotnych czasopismach medycznych. W związku z wysokim poziomem prac oraz zaangażowaniem znamienitych członków Jury, bylibyśmy wielce szczęśliwi, gdyby Polskie Towarzystwo Mikrobiologów doceniło nasz wysiłek w rozwój nauk podstawowych medycyny i objęło konferencję patronatem naukowym.
Więcej informacji o zeszłorocznej edycji Juvenes Pro Medicina znajdą Państwo na stronie: www.jpm.umed.pl.

Konferencja pod patronatem PTM

II OGÓLNOPOLSKIE SYNPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"
Lublin, 29-30 czerwca 2017

Celem Sympozjum jest podsumowanie dotychczasowej wiedzy i przedstawienie najnowszych osiągnięć w badaniach z zakresu metagenomiki, mikrobiologii, oddziaływań pomiędzy mikro- i makroorganizmami różnych środowisk oraz ich znaczenia dla rozwoju rolnictwa i ochrony środowiska.
Podczas konferencji zostaną zaprezentowane oraz przedyskutowane wyniki badań prowadzonych w ośrodkach naukowych, w tym także postęp w wykorzystaniu nowoczesnych metod badawczych w obszarze mikrobiologii środowiskowej. Przedstawione zostaną również dotychczasowe osiągnięcia na temat zastosowania narzędzi metagenomiki najnowszej generacji w badaniach środowiskowych. Sympozjum będzie miejscem wymiany doświadczeń, nawiązywania kontaktów do realizacji wspólnych projektów badawczych oraz wydarzeniem naukowym na temat kompleksowego rozpoznania bioróżnorodności mikroorganizmów w różnych środowiskach oraz najnowocześniejszych metod badawczych stosowanych w mikrobiologii, biologii molekularnej i biotechnologii.
Przewidujemy organizację następujących sesji naukowych:
Sesja I - Narzędzia metagenomiczne – nowoczesne metody badań i identyfikacji mikroorganizmów i ich zbiorowisk;
Sesja II - Metagenomika środowiskowa – metagenomy różnych środowisk;
Sesja III - Metagenomika aplikacyjna – wykorzystanie i znaczenie metagenomiki w biotechnologii, biologicznej ochronie roślin oraz monitoringu jakości środowiska;
Sesja IV - Czynniki wpływające na jakość środowiska – badania i aspekty praktyczne.
Sekretariat Konferencji: Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, Instytut Agrofizyki PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin tel. 81 744 50 61 w. 177, e-mail: metagenomy@ipan.lublin.pl

Konferencja pod patronatem PTM

IX OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA HYDROMIKROBIOLOGICZNA
HYDROMICRO 2017:
DROBNOUSTROJE - OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA
17-19 września 2017, Olsztyn

Bardzo serdecznie zapraszamy na IX Ogólnopolską Konferencję Hydromikrobiologiczną, organizowaną w dniach od 17 do 19 września 2017 roku przez Katedrę Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Będzie to dziewiąte ogólnopolskie spotkanie środowisk naukowych związanych z mikroorganizmami ekosystemów wodnych. Poprzednie spotkania odbywały się w: Słupsku-Ustce (2000), Toruniu (2002), Zielonej Górze - Łagowie (2004), Mikołajkach (2006), Warszawie - Wierzbie (2008), Gdańsku (2010), Wrocławiu (2013) oraz Gliwicach (2015). Tematyka konferencji obejmuje: mikroorganizmy wód śródlądowych, podziemnych i morskich, mikroorganizmy w inżynierii środowiska, sanitarno – bakteriologiczne aspekty oczyszczania ścieków, transmisję mikroorganizmów patogennych drogą wodną, zanieczyszczenia biologiczne w systemach wodnych biobezpieczeństwo i bioremediację wód, diagnostykę organizmów wodnych, mikrobiologię przemysłową i biotechnologię.
Językiem konferencji jest język polski lub angielski Zgłoszenia (w postaci wypełnionej karty zgłoszenia uczestnictwa - do pobrania ze strony www.hydromicro2017.pl należy przesłać do 30 maja 2017 roku na adres: hydromicro@uwm.edu.pl Streszczenia w języku polskim lub angielskim przygotowane wg schematu zamieszczonego na stronie Konferencji prosimy przesyłać droga mailową do 30 czerwca 2017 roku. Konferencja odbędzie się w Olsztynie, w atrakcyjnie usytuowanym hotelu Omega.

W imieniu Komitetu Organizacyjnego
Dr hab. Zofia Filipkowska, prof. UWM

Konferencja pod patronatem PTM

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

Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego zapraszają na IV edycję konferencji pt. *„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”*.
Konferencja ma na celu prezentację badań z zakresu mikrobiologii i parazytologii jakie są prowadzone aktualnie w krajowych jak i zagranicznych jednostkach naukowych. Pragniemy również udokumentować historyczny dorobek polskich naukowców w tych dziedzinach. W tym roku szczególną uwagą objęty będzie problem uwarunkowanych środowiskowo chorób infekcyjnych i inwazyjnych, których czynnikami etiologicznym są patogeny transmitowane przez stawonogi (wektory), głównie hematofagiczne kleszcze i komary, a także ukazanie skutecznych sposobów zapobiegania i monitorowania tych zagrożeń.
Podczas konferencji planowana jest prezentacja praktycznych osiągnięć 20-letniej współpracy Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UWr z Wydziałem Środowiska i Rolnictwa Urzędu Miasta Wrocławia w zakresie biologicznego (mikrobiologicznego) zwalczania komarów na terenie Aglomeracji Wrocławskiej. Ważnym celem konferencji jest także integracja środowiska naukowego oraz ukazanie osiągnięć naukowych młodych adeptów nauki.
Szczegółowe informacje zamieszczone są na stronie: http://www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

Organizator: Uniwersytet Wrocławski Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Miejsce: Uniwersytet Wrocławski Instytut Genetyki i Mikrobiologii
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Konferencja pod patronatem PTM
7 Międzynarodowa Konferencja Weiglowska
Lwów, 26-29 września 2017 r.

http://cellbiol.lviv.ua/2017/

Rudolf Weigl był wybitnym polskim mikrobiologiem austriackiego pochodzenia. Pracował w czasach międzywojennych we Lwowie (dzisiejsza Ukraina) w dziedzinach mikrobiologii lekarskiej, parazytologii, immunologii oraz biotechnologii, opracowując przy tym pierwszą skuteczną szczepionkę przeciwko durowi plamistemu.
Mikrobiolodzy polscy i ukraińscy od 2003 r. organizują naprzemiennie w Polsce i Ukrainie dwustronne (później międzynarodowe) konferencje Weiglowskie w dziedzinie mikrobiologii i dyscyplinach pokrewnych. Poprzednie konferencje Weigowskie odbywały się we Lwowie (2003), Warszawie (2007), Odessie (2009), Wrocławiu (2011), Czerniowcach (2013) oraz w Gdańsku (2015). Kolejną, **7 konferencję Weiglowską** zaplanowano zorganizować we Lwowie, mieście, gdzie R. Weigl pracował.
Główne tematy konferencji to mikrobiologia ogólna, mikrobiologia lekarska, mikrobiologia środowiskowa, immunologia oraz biotechnologia. Konferencja odbędzie się w przepięknym Lwowskim Budynku Uczonych. Głównymi uczestnikami konferencji będą mikrobiolodzy ukraińscy i polscy, jednak przewiduje się także udział naukowców z innych krajów (Austria, Francja, Niemcy, Szwecja, Włochy, USA, Japonia). W konferencji weźmie udział około 250 uczestników. Oprócz programu naukowego, przewidziane są: wycieczka po Lwowie, koncert, recepcja oraz na życzenie - bankiet, spektakl w Operze Lwowskiej, a także wycieczka do pobliskich zamków. Konferencja przyczyni się do nawiązania bliższych kontaktów z naukowcami z Ukrainy oraz wzmocnieniu przyjacielskich stosunków między naszymi narodami.
Planuje się, ze opłata konferencyjna wyniesie 140 Euro oraz 110 Euro dla młodych naukowców. Koszty obejmą 3 obiady, recepcję, 5 poczęstunków podczas przerw na kawę, wycieczka po mieście oraz materiały konferencyjne. Dodatkowo płatne będą bankiet (około 40 Euro) oraz spektakl w operze Lwowskiej (10 Euro). Po konferencji można będzie odwiedzić zamek Oleski (1 dzień), Poczajow i Krzemieniec (1 dzień) lub Kamieniec Podolski (2 dni), wycieczki te są płatne dodatkowo.

7th International Weigl Conference (Lviv, September 26-29, 2017)

Rudolf Weigl was the outstanding Polish microbiologist of Austrian descent. He worked in the interwar period in Lviv (contemporary Ukraine) in the fields of medical microbiology, parasitology, immunology and biotechnology and created the first successful anti-typhus vaccine. Polish and Ukrainian microbiologists started in 2003 joint initiative to organize in turn in Ukraine and Poland bilateral (later, international) Weigl conferences in the fields

of microbiology and related disciplines. Previous Weigl conferences took place in Lviv (2003), Warsaw (2007), Odessa (2009), Wroclaw (2011), Chernivtsi (2013) and Gdansk (2015). The next, 7th International Weigl conference is planned to organize again in Lviv, the city, where he did his discoveries. The main topic of the conference will be general microbiology, medical microbiology, environmental microbiology, immunology and biotechnology. The conference is planned to be held in the beautiful House of Scientists. Main participants of the conference will be Polish and Ukrainian microbiologists, cell biologists and immunologists; however, participation of the scientists from many other countries is expected. Size of the conference is limited by 250 participants. In addition to scientific program, Lviv city tour, concert, get-together and optional banquet, visiting Lviv Opera House and the tours to neighboring castles are planned. Conference has to develop existing contacts and establish the new ones between Polish and Ukrainian scientists.

http://www.cellbiol.lviv.ua/2017
Ukrainian Society of Cell Biology

For the attention of specialists in the field of microbiology, biotechnology, immunology.
Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, All-Ukrainian Public Organization "Ukrainian Society of Cell Biology" inform you about:
7th International Weigl Conference that will be held on September 26-29, 2017 in Lviv, Ukraine, in the main building of Ivan Franko Lviv National University.
List of planned sessions:

1. Microbial cell biology.
2. Microbial biotechnology.
3. Environmental microbiology.
4. Metabolism and regulation.
5. Medical microbiology.
6. Immunology.
7. Microbe-host cell interaction.
8. Microbial genetics.

Participation of leading foreign and ukrainian scientists is expected in the Conference. Working language – English.

Conditions of participation:

Deadline for Abstract submission – **May 31, 2017**.
Registration form and abstracts should be filled and sent to the conference e-mail:

weigl2017@gmail.com

Early bird registration & payment (till May 31, 2017): 110 € / 90 €.

Materials received after the deadline will not be accepted. Each person may submit up to 3 abstracts. Invitation letters to the participants of the conference will be sent by email before 1st September 2017.

CONTACT INFORMATION
OF ORGANIZING COMMITTEE REPRESENTATIVES

Address: Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv, 79005 Ukraine.

Dmytruk K.V., Head of Secretariat
PhD, Senior Scientist
Phone: 00 380 32 261 21 63;
FAX: 00 380 32 261 2108,
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua // dmytruk77@gmail.com

Barska M.L., Executive Secretary of
Ukrainian Society of Cell Biology, PhD,
Phone: 00 380 32 261 2142;
FAX: 00 380 32 261 2108,
e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua

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, grzybiczych 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.