

# MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

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

2

ROK LXVIII      KWARTALNIK      2016  
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 – 5,5 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

- M. Kierzkowska, A. Majewska, A. Sawicka-Grzelak, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk. Spektrum mikrobiologiczne oraz lekowrażliwość bakterii izolowanych od pacjentów z zakażeniem wewnątrzbrzusznym .....95
- W. Waksmańska, J. Rutkiewicz, R. Bobiński. Zakażenia *Bordetella pertussis* w rejonie powiatu i miasta Bielsko-Biała .....103
- M. Tormanowska, T. Dzieciatkowski, S. Rynans, M. Przybylski, A. Gronkowska, G.W. Basak, G. Młynarczyk, A. Tomaszewska. Wstępne badania nad występowaniem chromosomowej integracji ludzkiego herpeswirusa typu 6 (CI-HHV-6) wśród polskich biorców i dawców krwiotwórczych komórek macierzystych ..... 113
- A. Majewska, M. Przybylski, P. Machura, G. Młynarczyk, T. Dzieciatkowski. Porównanie trzech testów multiplex real-time PCR do wykrywania DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2 ..... 119
- A. Kawalec, A. Białecka, A. Kasprowicz, W. Barabasz. Identyfikacja grzybów drożdżopodobnych izolowanych z dróg rodnych kobiet z wykorzystaniem spektrometrii mas typu MALDI-TOF ..... 127

### PRACE POGLĄDOWE

- A. Chróst. Grzyby pleśniowe w środowisku człowieka – zagrożenie i skutki zdrowotne ..... 135

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- M. Kierzkowska, A. Majewska, A. Sawicka-Grzelak, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk. Microbiologic spectrum and susceptibility of bacteria isolated from patients with intra-abdominal infection ..... 95
- W. Waksmańska, J. Rutkiewicz, R. Bobiński. *Bordetella pertussis* infections in the district of Bielsko and the city Bielsko-Biala ..... 103
- M. Tormanowska, T. Dzieciatkowski, S. Rynans, M. Przybylski, A. Gronkowska, G.W. Basak, G. Młynarczyk, A. Tomaszewska. Prevalence of CI-HHV-6 in patients with hematological diseases and healthy donors in Poland – preliminary study ..... 113
- A. Majewska, M. Przybylski, P. Machura, G. Młynarczyk, T. Dzieciatkowski. Comparison of three multiplex real-time PCR assays for the detection of herpes simplex viruses type 1 and type 2 DNA ..... 119
- A. Kawalec, A. Białecka, A. Kasproicz, W. Barabasz. Identification of yeasts isolated from the genital tract of women by mass spectrometry MALDI-TOF ..... 127

### REVIEWS

- A. Chróst. Health risks associated with the environmental presence of toxigenic moulds ..... 135

## Spektrum mikrobiologiczne oraz lekowrażliwość bakterii izolowanych od pacjentów z zakażeniem wewnątrzbrzusznym

### Microbiologic spectrum and susceptibility of bacteria isolated from patients with intra-abdominal infection

Marta Kierzkowska<sup>1,2</sup>, Anna Majewska<sup>1,2</sup>, Anna Sawicka-Grzelak<sup>1,2</sup>,  
Andrzej Młynarczyk<sup>2,3</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, Warszawa

<sup>3</sup>Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

---

**Zakażenia wewnątrzbrzuszne (IAIs) stanowią wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne. Występowanie oporności na antybiotyki stwarza ryzyko niepowodzenia terapii empirycznej. Profil wrażliwości bakterii wywołujących IAIs na antybiotyki wymaga stałego monitorowania zarówno w szpitalu jak i w skali regionu i świata. Wyniki analiz powinny być implementowane do programów nadzoru epidemiologicznego i ustalenia algorytmów leczenia.**

**Słowa kluczowe:** *palczki beztlenowe, oporność na antybiotyki, klindamycyna, Enterobacteriaceae, zakażenia chirurgiczne*

---

#### ABSTRACT

**Introduction:** With their multiple etiologies, IAIs have always been a diagnostic and therapeutic challenge. Development of drug resistance, and possibly multiple drug resistance, by the causative pathogens may pose difficulties in empirical treatment selection. The aim of the study was to analyze the etiology of bacterial intra-abdominal infections (IAIs) in patients hospitalized in surgical wards and to evaluate the mechanisms of antibiotic resistance.

**Methods:** The evaluated biological samples (fluids from abdominal cavity and bile) were obtained from patients with suspected or confirmed IAIs, hospitalized at a teaching hospital in Poland. Routine microbiological diagnostic tests were performed.

**Results:** The proportions of Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from

the analyzed peritoneal fluid and bile specimens were comparable. Multiple bacterial species were significantly more common in bile isolates than in peritoneal fluid isolates. A total of 61,7% of aerobic Gram-negative bacillus isolates obtained from peritoneal fluid and bile produced ESBL. The proportions of vancomycin-resistant enterococci (VRE) and enterococci exhibiting high-level aminoglycoside resistance (HLAR) were 32,6% and 43,5%, respectively. Ertapenem-resistant *K. pneumoniae* was detected in 22,2% of peritoneal fluid cultures and 71,4% of biliary cultures. Methicillin resistance was detected in 85,7% of staphylococcal isolates. The proportion of anaerobes detected in peritoneal fluids was relatively high at approximately 17% and included predominantly Gram-negative species. All Gram-negative anaerobes showed resistance to benzylpenicillin.

**Conclusions:** Etiologies and susceptibility pattern of IAIs must be monitored on a ward, hospital, regional, and world-wide scale and the findings implemented into epidemiologic surveillance programs and proposed treatment protocols.

**Keywords:** *anaerobic bacilli, antibiotic resistance, clindamycin, Enterobacteriaceae, surgery infection*

## WSTĘP

Zakażenia wewnątrzbrzusne (intraabdominal infections, IAIs) wywoływane są najczęściej przez drobnoustroje stanowiące normalną mikroflorę przewodu pokarmowego. W przypadku niektórych infekcji można przewidywać ich etiologię, jednakże występowanie zakażeń z udziałem kilku różnych gatunków bakterii oraz możliwość wystąpienia mechanizmów oporności drobnoustrojów, znacznie utrudniają dobór terapii empirycznej (2, 6, 10, 11). Konieczność monitorowania etiologii wewnątrzbrzusznych zakażeń u pacjentów szpitalnych, w poszczególnych rejonach geograficznych i globalnie jest oczywista i podkreślana przez wielu autorów. Poczynione obserwacje implementowane są do programów nadzoru epidemiologicznego i projektowania algorytmów leczenia (10, 11, 12, 15, 19). Zmiany etiologii zakażeń, oraz zmiany wrażliwości na leki, mogą wymuszać modyfikowanie antybiotykowej profilaktyki okołozabiegowej oraz zmianę algorytmu empirycznego leczenia tych zakażeń (3, 6).

Od pacjentów z zakażeniem wewnątrzbrzusznym najczęściej izolowane są bakterie Gram-ujemne. Często są to równocześnie zakażenia bakteriami tlenowymi i beztlenowymi. Stwierdzono wyższą śmiertelność u chorych zakażonych beztlenowcami z rodzaju *Bacteroides* spp. i/lub *Clostridium perfringens*, a także bakteriami rosnącymi tlenowo takimi jak: *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* oraz *Enterococcus* spp. (*E. faecium* i *E. faecalis*). Wykazano, że u blisko 4% biorców wątroby rozwija się IAI z udziałem *A. baumannii*, a śmiertelność z powodu zakażeń tym drobnoustrojem w tej grupie chorych wynosi 50-90% (5, 9).

Celem podjętych badań była analiza etiologii zakażeń w obrębie jamy brzusznej u chorych przebywających na oddziałach chirurgicznych szpitala klinicznego w Warszawie oraz analiza profilu oporności tych bakterii na antybiotyki.

## MATERIAŁ I METODY

Analizowano wyniki posiewów płynu z jamy brzusznej oraz żółci pobranych od pacjentów hospitalizowanych na oddziałach chirurgicznych w jednym z dużych szpitali klinicznych w Warszawie. Od marca 2014 do sierpnia 2015 pobrano 207 próbek klinicznych: 172 płynów z jamy brzusznej oraz 35 próbek żółci. Materiał pobierano w przypadku podejrzenia lub rozpoznania zakażenia w ramach rutynowych czynności diagnostycznych zgodnie z procedurą obowiązującą w szpitalu.

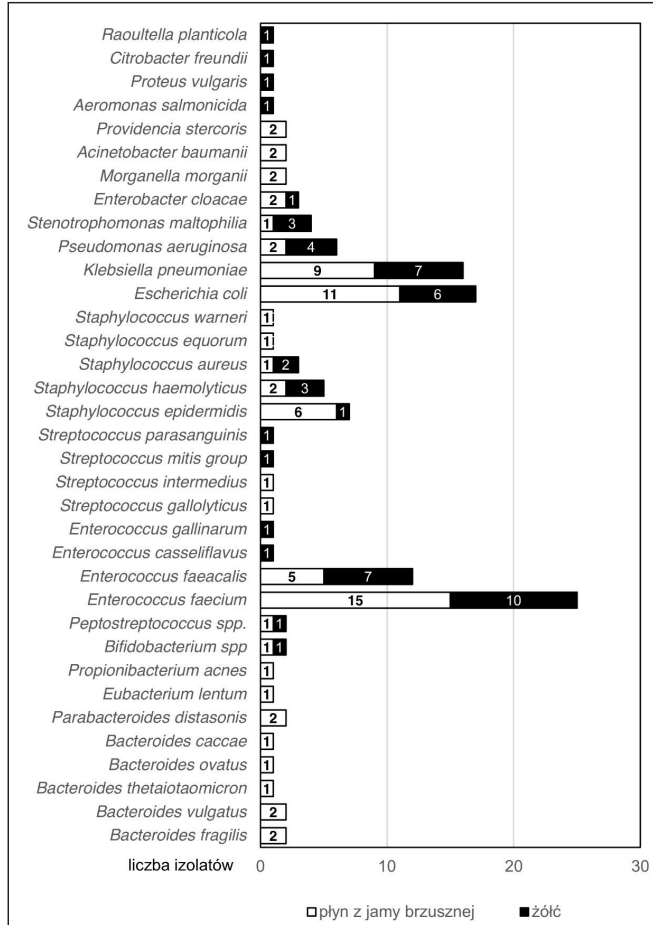
Schemat postępowania diagnostycznego obejmował: ocenę makroskopową i mikroskopową próbki pobranego materiału, hodowlę na podłożach mikrobiologicznych, ocenę makroskopową i mikroskopową wyhodowanych kolonii, identyfikację i oznaczanie lekowrażliwości. Materiał diagnostyczny posiewano na podłoża: Columbia agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (bioMérieux), podłoże MacConkey'a, podłoże z żółcią i eskuliną (inkubacja 24 godz., temp 37°C, atmosfera tlenowa) oraz Schaedler agar z 5% krwią baranią i wit K<sub>1</sub> (bioMérieux), które inkubowano 48 godz. w atmosferze beztlenowej. Wszystkie szczepy zidentyfikowano za pomocą spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry), z zastosowaniem systemu VITEK MS (bioMérieux).

Analizie wrażliwości na antybiotyki poddano tylko niepowtarzające się izolaty kliniczne, a oznaczenie lekowrażliwości wykonano w automatycznym systemie Vitek2 (bioMérieux). Dla bakterii z rodzaju *Bacteroides* i *Parabacteroides* określano najmniejsze stężenia hamujące metodą gradientowo-dyfuzyjną E-test (bioMérieux) dla następujących antybiotyków: penicylina benzylowa, amoksycylina z kwasem klawulanowym, klindamycyna, metronidazol i imipenem. Stosując metodę dyfuzyjno-krażkową wykrywano mechanizmy oporności w szczepach klinicznych; wytwarzanie β-laktamaz (ESBL, MBL, KPC) przez pałeczki Gram-ujemne (*Enterobacteriaceae* i niefermentujące). Analizy lekowrażliwości dokonano w oparciu o rekomendacje Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST). Analizy statystycznej wyników dokonano przy użyciu testu chi - kwadrat przyjmując poziom ufności dla p<0,05.

## WYNIKI

Ogółem z próbek klinicznych wyhodowano 131 izolatów bakterii. Z 48 dodatknych próbek płynów z jamy brzusznej wyhodowano 77 izolatów (średnio 1,60), a z 26 dodatknych próbek żółci wyhodowano 54 izolatów (średnio 2,08). Nie wykryto bakterii w 72,1% materiałów pobranych z jamy brzusznej oraz w 25,7% próbkach żółci. Znamienne częściej (p<0,05) uzyskiwano dodatnie posiewy z żółci, niż z próbek z płynów z jamy brzusznej. Z płynów z jamy brzusznej i żółci izolowano z porównywalną częstością bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Wyniki identyfikacji przedstawiono na rycinie 1 (Ryc.1). Wśród tlenowych bakterii Gram-ujemnych najczęściej identyfikowano pałeczki *E. coli* oraz *K. pneumoniae*, a wśród bakterii Gram-dodatnich dominował *E. faecium*.

Wśród dodatknych próbek płynu z jamy brzusznej bakterie bezwzględnie beztlenowe wykryto w 7 (14,6%) z nich. W 5 z tych próbek beztlenowcom towarzyszyły bakterie tlenowe. Z płynu z jamy brzusznej hodowano głównie pałeczki z rodzaju *Bacteroides* i *Parabacteroides*. W 2 próbkach żółci wykazano obecność po jednym gatunku bakterii beztlenowej (*Bifidobacterium* spp. oraz *Peptostreptococcus* spp.).



Ryc. 1. Liczba gatunków bakterii wyhodowanych z płynów z jamy brzusznej i próbek żółci.

Z badanych materiałów hodowano po jednym lub więcej różnych gatunków bakterii. Więcej niż jeden gatunek bakterii izolowano z żółci istotnie częściej niż z próbek płynu z jamy brzusznej ( $p < 0,05$ ). Z 54,2% płynów z jamy brzusznej wyhodowano pojedynczy izolat bakterii; 2, 3 lub 4 izolaty występowały odpowiednio w 33,3%, 10,4% i 2,1% próbek. Pojedyncze izolaty występowały w 26,9% próbek żółci, natomiast 2, 3 lub 4 izolaty zidentyfikowano odpowiednio w 46,2% i 15,4%, 11,5% badanych próbkach. Szczególnie często pałeczkom *K. pneumoniae* wyhodowanym z płynu z jamy brzusznej towarzyszyły bakterie *E. coli* lub *E. faecium*. W próbkach żółci szczepy *K. pneumoniae* izolowane były łącznie z *E. faecium*, *E. coli* lub z *E. faecalis*.

Wykazano, że 61,7% izolatów tlenowych pałeczek Gram-ujemnych pochodzących z płynów z jamy brzusznej i żółci wytwarzało  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL). Były to głównie *E. coli* (66,7%) i *K. pneumoniae* (63,6%). Również u 63,6% izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z próbek żółci wykryto ESBL, natomiast pałeczki *E. coli* nie wytwarzały ESBL.



Analizowano oporność pałeczek Gram-ujemnych na karbapenemy. Z płynów z jamy brzusznej wyizolowano 9 izolatów *K. pneumoniae*, z których 2 (22,2%) cechowała oporność na ertapenem. Jeden z nich był również oporny na imipenem, natomiast oba pozostały wrażliwe *in vitro* na meropenem. Z próbek żółci wyizolowano ogółem 7 szczepów *K. pneumoniae*, z czego 5 (71,4%) było opornych na ertapenem. Spośród tych szczepów 3 wykazywały jednocześnie oporność na imipenem i meropenem, a pozostałe 2 średnią wrażliwość na oba antybiotyki. Wszystkie odporne na karbapenemy szczepy *K. pneumoniae* wytwarzały ESBL. Oporność na imipenem i meropenem stwierdzono u 2 izolatów *P. aeruginosa* (po jednym z każdego materiału).

Z żółci wyizolowano także *A. salmonicida* i ESBL-dotatnie szczepy *E. coli*, *E. cloacae*, wszystkie odporne na ertapenem i zachowujące wrażliwość na imipenem i meropenem. Izolowane z płynów pałeczki *A. baumannii* wykazały oporność na imipenem i meropenem. Natomiast jeden szczep *E. cloacae* izolowany z płynu, podobnie jak izolat tego samego gatunku pochodzący z żółci prezentował oporność jedynie na ertapenem. Dla żadnego ze szczepów opornych na karbapenemy nie uzyskano dodatnich wyników w testach fenotypowych wykrywających KPC i MBL.

U około 32,6% i 43,5% enterokoków wykryto oporność odpowiednio na wankomycynę (VRE) i wysokie stężenie aminoglikozydów (HLAR). Oporność na wankomycynę występowała u 51,4% izolatów *E. faecium* i 17,6% izolatów *E. faecalis*. Oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów wykazano u 41,4% izolatów *E. faecium* i 47,1% izolatów *E. faecalis*. Oporność na metycylinę (MRCNS i MRSA) wykryto u 85,7% izolatów gronkowców.

Wszystkie wyizolowane pałeczki Gram-ujemne beztlenowo rosnące (n=9) wykazały oporność na penicylinę benzylową, 7 izolatów oporność na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, 1 szczep *B. fragilis* był oporny na klindamycynę.

## DYSKUSJA

Naturalna mikroflora przewodu pokarmowego to ekosystem złożony głównie z bakterii bezwzględnie beztlenowych (jest ich około 100 razy więcej niż tlenowych). Skład jakościowy i ilościowy mikroflory rezydującej w przewodzie pokarmowym, głównie w jelicie grubym zmienia się pod wpływem różnych czynników, a zwłaszcza leczenia antybiotykami (17, 18). W wielośrodkowym badaniu przeprowadzonym w Hiszpanii, w którym w ramach programu SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) analizowano 8869 materiałów od pacjentów z podejrzeniem IAI wykazano, że dominującym patogenem izolowanym z próbek klinicznych od pacjentów hospitalizowanych były pałeczki *Enterobacteriaceae*: *E. coli* (49,9%), *K. pneumoniae* (9,2%), *P. mirabilis* (5,5%), a wśród pałeczek niefermentujących *P. aeruginosa* (8,6%). Około 6,3% pałeczek Gram-ujemnych produkowała ESBL, najczęściej: *E. coli* (8,7%) i *K. pneumoniae* (8,4%), głównie u chorych po 60 roku życia (3). Podobne badanie przeprowadzono w Ameryce Północnej, w latach 2010-2011 zgromadzono 4208 Gram-ujemnych pałeczek wyizolowanych z zakażeń wewnętrzzbzusnych. Wśród *Enterobacteriaceae* najliczniej izolowano: *E. coli* (46, 4%), *K. pneumoniae* (19,7%), *E. cloacae* (10,1%), *P. mirabilis* (4,7%). Z 11,5% materiałów wyizolowano *P. aeruginosa* (12). Na uwagę zasługuje niedoszacowany udział bakterii beztlenowych, które jako główny składnik mikroflory jelita grubego również uczestniczą w IAI (13, 14).

Źródłem zakażenia wewnątrzbrzusznego mogą być bakterie rezydujące na skórze (przeniesione podczas lub w następstwie wykonywania inwazyjnych procedur medycznych) stąd znaczny odsetek koagulazo-ujemnych gronkowców i innych ziarenkowców Gram-dodatnich w badanych próbkach klinicznych (17). Badacze zajmujący się problematyką IAI zaobserwowali zmiany w epidemiologii zakażeń bakteryjnych u pacjentów po przeszczepieniu wątroby oraz ze spontanicznym zapaleniem otrzewnej (1, 8). Z powodu zmieniającej się epidemiologii zakażeń oraz selekcji szczepów opornych na antybiotyki leczenie empiryczne IAI w wielu przypadkach jest poważnym wyzwaniem terapeutycznym (8, 12, 16, 17). W pracach wykazano, że problem zakażeń wywołanych przez tlenowe bakterie Gram-ujemne głównie z rodziny *Enterobacteriaceae* wymusił profilaktyczne stosowanie fluorochinolonów. Odpowiedzią na powszechne stosowanie norfloksacyny było pojawienie się zakażeń Gram-dodatnimi ziarenkowcami, opornymi na fluorochinolony: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., a także *S. aureus* (1, 7, 19).

W prowadzonej analizie bakteriologicznej próbek klinicznych, podobnie jak inni badacze zauważyliśmy, że pałeczki *E. coli* oraz *K. pneumoniae* dominują zarówno w płynach pobranych z jamy brzusznej jak i żółci. Izolowane były również pałeczki niefermentujące: *P. aeruginosa* oraz *S. maltophilia*. Blisko 50% ogólnej liczby izolatów stanowiły bakterie Gram-dodatnie.

W prowadzonym badaniu wykazano bardzo wysoki poziom oporności bakterii na powszechnie stosowane antybiotyki. Około 60% wszystkich pałeczek Gram-ujemnych wytwarzało ESBL, 30% izolatów *K. pneumoniae* wykazała oporność na ertapenem, a część szczepów była także oporna na inne karbapenemy. Około 30% enterokoków było opornych na wankomycynę.

Z kolei badania prowadzone w szpitalach w Ameryce Północnej w latach 2010-2011, wykazały, że 8,3% izolatów *E. coli* i 8,9% izolatów *K. pneumoniae* wytwarzało β-laktamazy. Obserwacje te były zbieżne z poczynionymi w Hiszpanii, a oporność na ertapenem zanotowano u ponad 40% izolatów *K. pneumoniae* i *E. cloacae* (3, 12).

W programie SMART monitorującym trendy oporności bakterii związanych z komplikacjami wewnątrzbrzusznymi wzięły również udział niektóre kraje Azji. Niezmiennie wykazano, że gatunkami dominującymi w etiologii IAI były: *E. coli* i *K. pneumoniae*. W większości krajów na trzeciej pozycji wymieniany jest gatunek *P. aeruginosa*, chociaż w Indonezji częściej izolowany był *S. aureus*, a w Korei *Enterococcus* spp. Dane pochodzące z badania SMART z lat 2005-2010 wykazały, że w rejonie Azji i Pacyfiku występuje stale największy odsetek szczepów *E. coli*, *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* wytwarzających ESBL i jest on wyższy o około 40 % w porównaniu z innym krajami na tym kontynencie, np. w Wietnamie i na Filipinach. Na oddziałach intensywnego nadzoru izoluje się odpowiednio 81% i 58,8% pałeczek ESBL-dodatnich. Na Tajwanie odsetek opornych izolatów jest znacznie niższy, wynosi odpowiednio 7,5% i 7% dla *E. coli* i *K. pneumoniae* (15). Analiza lekowrażliwości pałeczek Gram-ujemnych hodowanych w 9 ośrodkach w Indiach od pacjentów z IAI wykazała, że 79% izolatów *E. coli*, 70% izolatów *K. pneumoniae* i 100% izolatów *K. oxytoca* produkowało β-laktamazy. Wśród ESBL-dodatnich izolatów *E. coli* wykazano wysoką wrażliwość na karbapenemy: imipenem (97%) i ertapenem (95%). ESBL-dodatnie izolaty *K. pneumoniae* charakteryzowały się wrażliwością na imipenem (94%). Około 80% izolatów tego gatunku było wrażliwych na ertapenem (4).

## WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki potwierdzają dominującą rolę pałeczek *Enterobacteriaceae* w zakażeniach w jamie brzusznej. Około 60% wszystkich pałeczek Gram-ujemnych wytwarzało ESBL.
2. Uzyskano zastanawiająco wysoki odsetek wyhodowań *E. faecium*, z czego około 51% i 41% izolatów było opornych odpowiednio na wankomycynę i wysokie stężenie aminoglikozydów.
3. W badanych materiałach stwierdzono obecność beztlenowców (około 17%, głównie pałeczek Gram-ujemnych). W piśmiennictwie brakuje wyników dotyczących częstości występowania oraz analizy oporności na antybiotyki bakterii bezwzględnie beztlenowych. Oczywistym jest, że ta grupa bakterii nie może być pomijana w opracowywaniu terapii empirycznej.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Alexopoulou A, Papadopoulos N, Eliopoulos DG* i inni. Increasing frequency of gram-positive cocci and Gram-negative multidrug-resistant bacteria in spontaneous bacterial peritonitis. *Liver Int* 2013; 33: 975-81.
2. *Armstrong C*. Updated Guideline on Diagnosis and Treatment of Intra-abdominal Infections. *Am Fam Physician* 2010; 82: 904-9.
3. *Canton R, Loza E, Aznar J* i inni. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms from intra abdominal infection and evolution of isolates with extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the SMART study in Spain (2002-2010). *Rev Esp Quimioter* 2011; 24: 223-32.
4. *Chaudhuri BN, Rodrigues C, Balaji V* i inni. Incidence of ESBL producers amongst Gram-negative bacilli isolated from intra-abdominal infections across India (based on SMART study, 2007 data). *J Assoc Physicians India* 2011; 59: 287-92.
5. *Claridge J, Banerjee A, Kelly KB* i inni. Bacterial Species-Specific Hospital Mortality rate for Intra-Abdominal infections. *Surg Infect* 2014; 15: 194-9.
6. *De Waele J, Lipman J, Sakr Y* i inni. EPIC II Investigators. Abdominal infections in the intensive care unit: characteristics, treatment and determinants of outcome. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 420.
7. *Falcone M, Russo A, Pacini G* i inni. Spontaneous bacterial peritonitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a patient with cirrhosis: the potential role for daptomycin and review of the literature. *Infectious Disease Report* 2015; 7: 56-9.
8. *Fernández J, Acevedo J, Castro M* i inni. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012; 55: 1551-6.
9. *Gao F, Ye Q, Wan Q, Liu S* i inni. Distribution and resistance of pathogens in liver transplant recipients with *Acinetobacter baumannii* infection. *Ther Clin Risk Manag* 2015; 11: 501-5.
10. *Gopalakrishnan R*. Intra-abdominal infections: do we need to change our antibiotic coverage in this era of Gram negative resistance? *J Assoc Physicians India* 2011; 59: 285.
11. *Hagel S, Scheuerlein H*. Perioperative Antibiotic Prophylaxis and Antimicrobial Therapy of Intra-Abdominal Infections. *Viszeralmedizin* 2014; 30: 310-6.
12. *Hoban DJ, Badal R, Bouchillon S* i inni. *In vitro* susceptibility and distribution of beta-lactamases in North America 2010-2011. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79: 367-72.
13. *Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A* i inni. Participation of strictly anaerobic bacteria in infections among hospitalized transplant patients in a clinical hospital in Warsaw. *Transplant Proc* 2011; 43: 3130-1.

14. *Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A* i inni. Specific character of anaerobic bacterial infections in patients treated in transplantation wards at one of the clinical hospitals in Warsaw. *Transplant Proc* 2014; 47: 2586-8.
15. *Kurup A, Liau KH, Ren J* i inni. Antibiotic management of complicated intra-abdominal infections in adults: The Asian perspective. *Ann Med Surg (Lond)* 2014; 3: 85-91.
16. *Li YT, Yu CB, Huang JR* i inni. Pathogen profile and drug resistance analysis of spontaneous peritonitis in cirrhotic patients. *WJG* 2015; 21: 10409-17.
17. *Pungpapong S, Alvarez S, Hellinger WC* i inni. Peritonitis after liver transplantation: Incidence, risk factors, microbiology profiles, and outcome. *Liver Transplantation* 2006; 12: 1244-52.
18. *Samuelsson A, Isaksson B, Jonasson J* i inni. Changes in the aerobic faecal flora of patients treated with antibiotics for acute intra-abdominal infection. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 820-7.
19. *Singh N, Wagener MM* i inni. Bacteremias in Liver Transplant Recipients: Shift Toward Gram-negative Bacteria as Predominant Pathogens. *Liver transplantation* 2004; 10: 844-9.

Otrzymano: 25 VII 2016 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM

## Zakażenia *Bordetella pertussis* w rejonie powiatu i miasta Bielsko-Biała

### *Bordetella pertussis* infections in the district of Bielsko and the city Bielsko-Biala

Wioletta Waksmajska<sup>1</sup>, Jarosław Rutkiewicz<sup>1,2</sup>, Rafał Bobiński<sup>1</sup>

Wydział Nauk o Zdrowiu, Katedra Pielęgniarstwa i Ratownictwa Medycznego,  
Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku- Białej<sup>1</sup>  
Powiatowa Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bielsku-Białej<sup>2</sup>

---

**W 2012 roku w Polsce odnotowano zapadalności na krztusiec o 180% wyższą niż w roku 2011, co może być między innymi związane ze spadkiem liczby wykonywanych szczepień wskutek nie wyrażania zgody opiekunów na przeprowadzanie szczepień ochronnych u dzieci. Objawy krztuśca mogą występować z różnym nasileniem w zależności od wieku pacjenta, stanu zdrowia, liczby przyjętych dawek szczepienia przeciw krztuścowi. Celem pracy była analiza potwierdzonych przypadków krztuśca w latach 2004 – 2013 na terenie powiatu bielskiego i miasta Bielsko-Biała.**

**Słowa kluczowe:** *krztusiec, szczepienia ochronne, dzieci*

---

#### ABSTRACT

**Introduction:** In the recent years there has been an increase in the incidence of infectious diseases that may be caused by the lack of guardians' consent to carry out immunization among children. In Poland in 2012 there was an increase in the incidence of pertussis 180% higher than in 2011. Occurring symptoms of pertussis can occur with varying intensity depending on the patient's age, his general health and the number of taken doses of vaccination against pertussis. The aim of the study was the analysis of reported in the years 2004 - 2013 confirmed cases of pertussis in the district of Bielsko and the city Bielsko-Biala, regarding to the prevalence of disease, the age of patients and the current course of compulsory vaccination against pertussis.

**Methods:** The analysis comprised 110 people with confirmed infection with *Bordetella pertussis*. The analysis included data from the years 2004-2013.

**Results:** On the basis of the analysis of the results the highest number of the patients with

pertussis was reported in 2012. Women suffered more often than men. The median of the age of patients was 14 years. Pertussis was diagnosed in 7 infants, of which 5 have not yet received vaccination against pertussis. After 17 years of age incidence of pertussis occurred sporadically and involved 1-2 cases in each age group. 15,5% of patients had mandatory vaccination, and 52,7% of patients who suffered from pertussis received all doses of the primary vaccination, compulsory to the second year of life.

**Conclusions:** Between 2004-2013 in the district of Bielsko and the city Bielsko-Biala recorded 110 cases of pertussis, with the highest incidence in 2012. The largest group of patients were adolescents aged 14-16 years who have had vaccinations against pertussis, in force until the second year of life.

**Keywords:** *pertussis, vaccinations, children*

## WSTĘP

Szczepienia ochronne stymulują układ odpornościowy człowieka do wytwarzania przeciwciał. Pamięć immunologiczna, którą uzyskuje organizm po zastosowaniu szczepienia powoduje, że przy kolejnym kontakcie z antygenem odpowiedź układu odpornościowego jest bardziej dynamiczna, szybsza i silniejsza, a przez to objawy choroby mogą w ogóle nie wystąpić lub wystąpić w łagodniejszej postaci. W ostatnich latach w Polsce obserwuje się wzrost częstości zachorowań na niektóre choroby zakaźne, co może być w niektórych przypadkach związane ze spadkiem liczby szczepionych osób wskutek nie wyrażania zgody opiekunów na przeprowadzanie szczepień ochronnych dzieci (1, 10). W 2012 roku odnotowano zapadalność na krztusiec o 180% wyższą w porównaniu do roku 2011 (18).

Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że w 2008 roku na świecie aż 95% przypadków krztuśca wystąpiło w krajach rozwijających się, a około 195 tysięcy dzieci z powodu tej choroby zmarło (7). Ostre infekcje dróg oddechowych wywołane przez *Bordetella pertussis* są jedną z 10 najczęstszych przyczyn zgonów wśród niemowląt i małych dzieci (2, 7). Występowanie krztuśca wśród młodzieży i dorosłych, obserwowane na całym świecie, stanowi istotny problem zdrowia populacyjnego i wyzwanie dla zarządzających ryzykiem w przestrzeni zdrowia publicznego (1, 2, 7, 10). Badania przeprowadzone przez *Terranella* i wsp. (15) nad metodami profilaktyki krztuśca wykazały, że szczepienia kobiet w czasie ciąży mogą zapobiec większej liczbie zachorowań z powodu krztuśca u niemowląt niż szczepienie przeprowadzone po porodzie.

Krztusiec, zwany potocznie kokluszem, jest chorobą wywoływaną przez pałeczkę krztuśca *Bordetella pertussis* lub pałeczkę parakrztuśca *Bordetella parapertussis*. Do zakażenia dochodzi drogą kropelkową, a pierwsze objawy pojawiają się po około 7 dniach od zakażenia (7). Do klasycznych objawów krztuśca można zaliczyć gorączkę, wysiłek oddechowy i kaszel. Kaszel jest napadowy, suchy, męczący z charakterystycznym świstem wdechowym przypominającym pianie koguta. U niemowląt może dochodzić do okresowych bezdechów (2, 7). Występujące objawy mogą występować z różnym nasileniem w zależności od wieku pacjenta, jego ogólnego stanu zdrowia czy liczby przyjętych dawek szczepienia przeciw krztuścowi (2). Nieleczony pacjent może być źródłem zakażenia nawet przez 3 tygodnie (7). Zakażenie wywołane przez *B. parapertussis* ma zazwyczaj przebieg łagodniejszy od zakażenia wywołanego pałeczką krztuśca.

Rozpoznanie krztusca bywa utrudnione, ze względu na występowanie zakażeń mieszanych(5). Przebieg kliniczny choroby u osób dorosłych może być niecharakterystyczny wobec czego może nastęrczać duże trudności diagnostyczne. Ponadto, lekarze postrzegając krztusiec jako chorobę wieku dziecięcego, mogą w rozpoznaniu różnicowym u dorosłych nie brać jej pod uwagę (2, 5, 14).

Celem pracy była analiza zgłoszonych w latach 2004 – 2013 potwierdzonych przypadków krztusca na terenie powiatu bielskiego i miasta Bielsko-Biała, pod kątem częstości występowania zachorowań w poszczególnych latach, wieku chorych i dotychczasowego wykonania u tych osób obowiązkowych szczepień przeciw krztuscowi.

## MATERIAŁ I METODY

Analizą objęto dane odnoszące się do 110 osób, z rozpoznaniem zakażeniem pałeczkami *Bordetella pertussis*. Analizie poddano informacje będące w dyspozycji Państwowej Inspekcji Sanitarnej, tj. odnotowane w „wywiadach o chorobie zakaźnej”, zgromadzone przez pracowników Sekcji Epidemiologii Powiatowej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bielsku-Białej, a także w „formularzach zgłoszenia podejrzenia lub rozpoznania zakażenia lub choroby zakaźnej” przesyłanych przez lekarzy. Rozpoznań dokonywano w oparciu o definicję przypadku, na podstawie obrazu klinicznego, poziomu swoistych przeciwciał IgA, IgM, IgG a także powiązań epidemiologicznych.

## WYNIKI

Na podstawie analizy danych dotyczących osób zamieszkujących miasto Bielsko-Biała i powiat bielski, u których w latach 2004-2013 rozpoznano krztusiec, można stwierdzić, że największą liczbę chorych odnotowano w roku 2012 (34 przypadki) i 2011 (22 przypadki). Najmniej zachorowań odnotowano w 2007 roku (2 przypadki). Częściej chorowały osoby płci żeńskiej (57,3%) niż męskiej (42,7%) (Tabela I). W 2004 i 2007 roku wszyscy chorzy, u których rozpoznano krztusiec były hospitalizowane. W całym analizowanym okresie średnio co trzecia osoba z rozpoznaniem krztuscem trafiała do szpitala (Tabela II). Mediana wieku chorych wyniosła 14 lat, najstarsza chora osoba miała 62 lata. Biorąc pod uwagę początek zachorowania (wystąpienie pierwszych objawów choroby) najwięcej zachorowań na krztusiec zaobserwowano w miesiącach: maju (15 przypadków), lutym (13 przypadków) oraz czerwcu i lipcu (po 12 przypadków). Najmniej zachorowań zaobserwowano w styczniu (4 przypadki) (Tabela II).

Analizując częstość zachorowań w zależności od wieku chorych stwierdzono, że najczęściej chorowały nastolatki w wieku 14 lat (14 przypadków), 15 lat (12 przypadków) i 16 lat (10 przypadków). W pierwszym roku życia zachorowało 7 niemowląt (4 z nich zachorowało w 2 miesiącu życia). W grupach wiekowych po 17 roku życia krztusiec rozpoznawano sporadycznie, 1-2 przypadki w każdej grupie wiekowej (Ryc. 1). W grupie dzieci do pierwszego roku życia, w 5 przypadkach zachorowanie dotknęło niemowlęta, u których nie rozpoczęto jeszcze szczepień ochronnych przeciwko krztuscowi, a w jednym przypadku, pierwsze objawy choroby wystąpiły w 6 dobie po zaszczepieniu pierwszą dawką szczepionki.

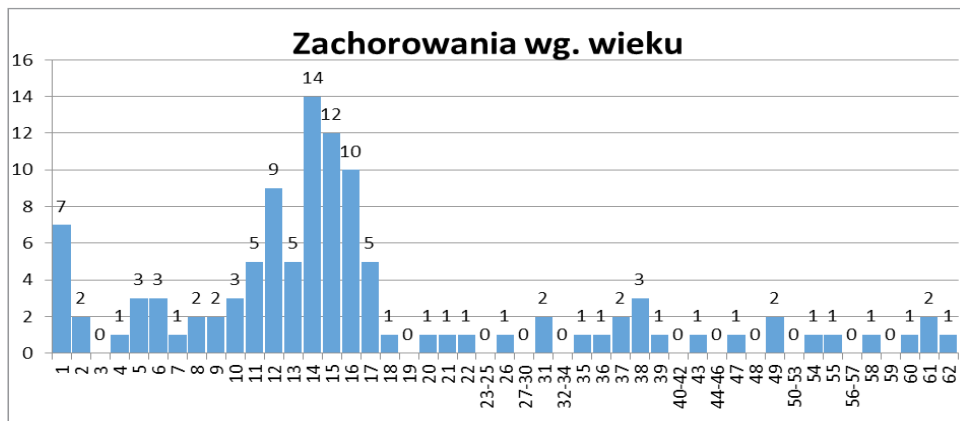
Tabela I. Częstość występowania, mediana i rozpiętość wieku chorych z rozpoznaniem krztuścem w latach 2004-2013.

Rok	Liczba przypadków			Mediana i rozpiętość wieku chorych w latach			Hospitalizowani	
	Ogółem	Kobiety	Mężczyźni	Ogółem	Kobiety	Mężczyźni	Liczba	Odsetek
2004	9	7	2	13 (12-16)	13 (12-16)	12 (11-14)	9	100%
2005	7	2	5	12 (6-17)	11 (10-12)	12 (6-17)	5	71%
2006	8	5	3	17 (0-36)	20 (0-36)	11 (11-12)	3	38%
2007	2	1	1	11 (5-17)	17	5	2	100%
2008	12	7	5	15 (0-49)	19 (0-49)	10 (2-15)	4	33%
2009	4	2	2	8 2-18	3 2-5	12 5-18	2	50%
2010	3	2	1	27 (0-49)	40 (31-49)	0	0	0
2011	22	12	10	17 (0-61)	20 (0-61)	14 (0-18)	4	18%
2012	34	20	14	22 (0-58)	21 (0-61)	22 (6-58)	4	12%
2013	9	5	4	28 (9-62)	37 (12-62)	17 (9-22)	0	0
Razem	110 (100%)	63 (57,3%)	47 (42,7%)	18 (0-62)	21 (0-62)	15 (0-58)	33	30%

Tabela II. Częstość zachorowań w poszczególnych miesiącach w latach 2004-2013.

Miesiąc zachorowania	Liczba przypadków	Odsetek
Styczeń	4	3,6
Luty	13	11,8
Marzec	8	7,3
Kwiecień	7	6,4
Maj	15	13,7
Czerwiec	12	10,9
Lipiec	12	10,9
Sierpień	6	5,5
Wrzesień	10	9
Październik	10	9
Listopad	7	6,4
Grudzień	6	5,5





Rycina 1. Częstość zachorowań na krztusiec w analizowanej grupie chorych w poszczególnych grupach wiekowych.

Z pośród 110 analizowanych przypadków krztusca, 8 nie otrzymało żadnej dawki szczepionki zapobiegającej tej zakaźnej chorobie (w tym 5 niemowląt), 52,7% otrzymało wszystkie dawki szczepienia podstawowego, obowiązującego do drugiego roku życia. Udokumentowane pełne szczepienie obowiązkowe przebyło 15,5% chorych. Jedna osoba, która otrzymała oprócz szczepień obowiązkowych (podstawowych) jedno szczepienie zalecane również zachorowała. W odniesieniu do 16,4% chorych nie uzyskano wiarygodnych informacji na temat przebytych szczepień przeciwko krztuścowi (Tabela III). W 48% przypadków objawy choroby wystąpiły po upływie 10 lat od zastosowania ostatniej dawki szczepienia przeciw krztuścowi (Tabela IV). Najczęściej opisywanymi objawami, które występowały u chorych to: napadowy kaszel prowadzący niekiedy do wymiotów, uczucie duszności, ogólne osłabienie, podwyższona temperatura ciała. W analizowanej grupie chorych wyodrębniono 8 ognisk, w których można było wykazać pomiędzy zakażonymi powiązania epidemiologiczne. W dwóch ogniskach doszło do zakażenia 4 osób, w trzech 3 osób oraz także w trzech 2 osób. W jednym ognisku do zakażenia doszło w placówce służby zdrowia (zakażony lekarz od pacjenta), w dwóch przypadkach zakażenia szerzyły się zarówno w środowisku domowym jak i szkole (Tabela V).

Tabela III. Zestawienie liczby przypadków krztusca i liczby otrzymanych dawek szczepionki przeciwko krztuścowi.

Otrzymane dawki szczepionki	Liczba osób	Odsetek
0	8	7,3
1	1	0,9
3	7	6,4
3+1	58	52,7
3+1+1	17	15,5
3+1+1+1	1	0,9
Brak danych	18	16,4

Tabela IV. Częstość występowania przypadków krztuśca z uwzględnieniem 10-letniego okresu od podania ostatniej szczepionki.

Liczba chorych, u których od ostatniej dawki szczepienia upłynęło >10 lat	Liczba chorych, u których od ostatniej dawki szczepienia upłynęło <10 lat	Liczba chorych nie- szczepionych (lub brak danych)
53 (48%)	31 (28%)	26 (24%)

Tabela V. Ogniska powiązanych epidemiologicznie przypadków krztuśca, z uwzględnieniem roku i miesiąca wystąpienia zachorowania, wieku i liczby chorych w ognisku zakażenia oraz środowiska (K – kobieta, M- mężczyzna).

Rok, miesiąc	Liczba osób w ognisku: płeć, wiek w latach	Środowisko
2006 październik	3 osoby: K 37, M 11, M11	szkoła
2008 styczeń/luty	2 osoby: M 12, M 10	dom
2011 luty/marzec/kwiecień	3 osoby: M 16, K 15, M 15	szkoła
2011 kwiecień/maj/czerwiec	3 osoby: K 38, M 16, K 14	dom
2012 marzec/kwiecień/maj	4 osoby: M39, K 38, K 14, M 14	dom/szkoła
2012 maj/czerwiec	4 osoby: M 54, K 14, M 13, K 11	dom/szkoła
2012, lipiec	2 osoby: K 60, K 14	placówka służby zdrowia
2013 marzec	2 osoby: K 12, M 9	dom

## DYSKUSJA

W 1974 roku WHO rozszerzyło program szczepień o obowiązkowe szczepienie przeciw krztuścowi. Zgodnie z zaleceniami WHO należało stosować 3 dawki szczepionki. Działania te spowodowały, że w 2008 roku zgodnie z tymi zaleceniami zostało zaszczepionych 82% wszystkich dzieci na całym świecie (7). Schematy szczepień przeciw krztuścowi są różne w poszczególnych państwach, jednak stosowanie 3 dawek szczepienia w ciągu pierwszych 6 miesięcy życia, wykonywane jest w większości krajów (14). W Polsce, zgodnie z Komunikatem Głównego Inspektora Sanitarnego z dnia 30 października 2014 roku w sprawie Programu Szczepień Ochronnych na rok 2015, szczepienie przeciw krztuścowi jest szczepieniem obowiązkowym. Schemat szczepienia obowiązkowego to 5 dawek szczepionki (w 2, 3-4, 5-6 i 18 miesiącu życia oraz szczepienie przypominające w 6 roku życia) (9). Słuszność stosowania trzech dawek szczepienia u niemowlęcia oraz dawki przypominającej w 2 roku życia potwierdziły badania *Quinn* i współautorów. Badania przeprowadzone w Australii wykazały, że trzy dawki szczepienia w okresie niemowlęcym zapewniają ochronę przed zachorowaniem na krztusiec jedynie w ciągu jednego roku od podania pierwszej dawki (11). Pominięcie więc dawki w drugim roku życia powoduje bardzo szybki spadek odporności (11, 12).

W analizowanym materiale własnym 52,7% osób otrzymało szczepienie, które według *Quinn* i współautorów powinno zabezpieczyć przed zachorowaniem: 3 dawki w okresie niemowlęcym i 1 dawkę przypominającą w drugim roku życia. Co więcej 15,5% osób, które zachorowały na krztusiec zostało zaszczepionych pełną dawką obowiązkowego szczepienia (3 dawki w 1 roku życia oraz dawki uzupełniające w 2 i 6 roku życia).

Zgodnie z Programem Szczepień Ochronnych obowiązującym w Polsce w 2015 roku zalecane (nie obowiązkowe) jest również stosowanie szczepienia przeciw krztuścowi w 14 i 19 roku życia, wraz ze szczepionką przeciw błonicy i tężcowi (9). Należy bowiem pamiętać, że wraz z upływem czasu od otrzymanego szczepienia dochodzi do spadku odporności (12). Na podkreślenie zasługuje fakt, że obowiązkowe szczepienie bezkomórkową komponentą krztuścową stosowane w 6 roku życia, zostało wprowadzone w Polsce do Programu Szczepień Ochronnych w 2003 roku, ze względu na utrzymujący się stały wzrost zachorowań (10). Pomimo wprowadzenia w 2003 roku szczepienia u 6-latków, w analizowanym materiale własnym przypadającym na lata 2004-2013 stwierdzono znaczny wzrost częstości zachorowań na krztusiec w 2012 roku (34 przypadki zachorowań) oraz nieco mniejszy w 2011 roku (22 przypadki zachorowań), wobec średnio utrzymującej się w pozostałych latach częstości zachorowań poniżej 10 przypadków.

Według danych NIZP-PZH w 2012 roku wystąpiła najwyższa od 40 lat liczba zachorowań na krztusiec (6, 18). Być może wzrost częstości zachorowań wynika z faktu pojawienia się nowych genetycznych mutacji w szczepach *Bordetella pertussis* (10). Z drugiej strony aby uzyskać znaczący spadek zachorowań zastosowane dodatkowe szczepienie musi objąć większą grupę dzieci (stosowanie szczepień przez okres kilku lat). Przy wzroście liczby zachorowań istotne jest również występowanie tzw. „epidemii wyrównawczych chorób zakaźnych”, związanych z naturalnym spadkiem odporności u osób zaszczepionych (13). Zrozumienie związku między czasem wykonania szczepienia, a wystąpieniem zachorowania, może wpłynąć na podejmowanie działań zmierzających do bardziej świadomych wyborów przy ustalaniu harmonogramu szczepień (14, 17). Ze względu na rosnącą zachorowalność wśród młodzieży i dorosłych do schematów szczepień, dodatkowe szczepienia u młodzieży wprowadziły Niemcy, Francja, Austria, Kanada i Australia (10, 14). Natomiast rutynowe szczepienie dorosłych wykonywane co 10 lat, zalecane jest w Szwajcarii i Luksemburgu (10). W 2010 roku w stanie Kalifornia w USA, przeanalizowano szczepienia przeciwko krztuścowi w latach 2005-2010 w grupie dzieci przedszkolnych. Wykazano, że częstość występowania krztuśca była dwukrotnie wyższa na terenach gdzie rezygnowano ze szczepień (1). Skuteczność stosowania szczepień potwierdzają badania przeprowadzone we Włoszech przez *Gonfiantiniego* i współautorów, którzy stwierdzili zmniejszenie zachorowalności, po zwiększeniu odsetka zaszczepionych dzieci w 1995 roku (po wprowadzeniu do szczepień bezkomórkowych komponentów krztuśca). Dodatkowy wzrost zmniejszenia zachorowalności zaobserwowano w 2002 roku, po zaoferowaniu bezpłatnego szczepienia we wszystkich regionach Włoch (4). W krajach, gdzie wprowadzono obowiązkowe i powszechne szczepienia przeciw krztuścowi zmniejszyła się liczba zgonów z powodu tej choroby (10).

W przypadku chorób zakaźnych istnieje obowiązek powiadamiania o tym zdarzeniu odpowiednie instytucje, co zostało uregulowane stosownymi aktami prawnymi wydawanymi już od 1901 roku (4). W Polsce obowiązująca Ustawa z dnia 5 grudnia 2008 roku „*O zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi*”, nakłada na lekarza obowiązek niezwłocznego zgłaszania podejrzenia lub rozpoznania choroby zakaźnej (w tym krztuśca) (16). Jednak według WHO, liczba zgłaszanych przypadków krztuśca są znacznie niższe, niż rzeczywista częstość występowania tej choroby (14). Według *Lutyńskiej* i wsp. (10) rejestrowane są jedynie te przypadki krztuśca, w których obraz kliniczny jest typowy. Zgłaszalność może więc stanowić jedynie 1-36% rzeczywistie występujących przypadków krztuśca.

Pomimo zaniżonej ilości zgłoszeń przypadków krztuśca oraz wprowadzenia obowiązkowego szczepienia, zwiększa się częstość występowania tej choroby, zarówno u niemowląt i młodzieży jak i u dorosłych (14). W badaniach własnych stwierdzono najwyższą zachorowalność w miesiącach luty, czerwiec i lipiec. Nie potwierdziło się to w badaniach przeprowadzonych w Łodzi, gdzie najwyższą zachorowalność stwierdzono pomiędzy wrześniem a listopadem (8). Według *Dulnej* (3) zachorowania na krztusiec występują przez cały rok, z największym nasileniem w okresie wiosenno-zimowym. Zakażenie krztuścem szerzy się drogą powietrzno-kropelkową. Wśród pierwszych objawów pojawiających się u chorych wymienić należy nieżyt górnych dróg oddechowych (5). Jest to jednocześnie okres największej zakaźności. Badania retrospektywne przeprowadzone w Brazylii przez *Bellettiego* i współautorów wykazały, że najczęstszymi objawami towarzyszącymi krztuścowi były: kaszel, nadmierna ilość wydzieliny w drogach oddechowych, sinica, wymioty występujące po kaszlu oraz gorączka. Sinica była objawem występującym w 81,3% przypadków u niemowląt. Jednocześnie autorzy stwierdzili, że od września 2011 do stycznia 2013 roku śmiertelność z powodu krztuśca wynosiła 2,5% (2). Według danych brytyjskich nawet u dzieci zaszczepionych pełną dawką szczepionki głównym objawem krztuśca jest kaszel (17).

W analizowanym materiale własnym, w trakcie przebiegu krztuśca obserwowano występowanie kaszlu prowadzącego niekiedy do wymiotów, podwyższonej temperatury ciała, uczucia duszności i ogólnego osłabienia. W całej Polsce zaobserwowano przesunięcie zachorowań na grupę młodzieży między 10-14 rokiem życia (6). Jest to zgodne z utrzymywaniem się odporności: po zastosowaniu szczepienia przeciw krztuścowego to czas od 3 do 10 lat, natomiast po przechorowaniu krztuśca 10-15 lat (13). Powoduje to, że dzieci w wieku 10-13 lat nie są chronione przed zachorowaniem (3). Przedstawiona analiza wykazała, że częstość występowania krztuśca u osób powyżej 17 roku wyraźnie spadała, w porównaniu z częstością występowania tej choroby u młodzieży poniżej 17 roku życia, gdzie najwyższą liczbę chorych stanowiły czternastolatki. Jednak według *Bellettiniego* (2) niska częstość rozpoznawania krztuśca wśród dorosłych może wynikać z faktu, że lekarze nie podejrzewają występowania tej choroby w tej grupie wiekowej. Przebieg choroby u dorosłych może być również nietypowy. Krztusiec, podobnie jak ospa wietrzna i odra charakteryzuje się wysoką zaraźliwością – wskaźnik podatności na zakażenie wynosi 90%.

W badaniach własnych odnotowano 8 ognisk szerzenia się zakażenia obejmujące łącznie 23 osoby (21%). Ogniska te zlokalizowane były głównie w środowisku domowym i szkolnym (87,5% chorych).

Badania przeprowadzone w Łodzi w latach 1997-1998 pozwoliły na stwierdzenie źródła zakażenia w 16,6% przypadków. W większości przypadków była to szkoła lub przedszkole (8). Zbiorowości społeczne, do których zaliczyć można przedszkola, szkoły czy zakłady pracy to miejsca, które wymagają szczególnego nadzoru epidemiologicznego.

## WNIOSKI

1. W latach 2004-2013 na terenie powiatu bielskiego i miasta Bielsko-Biała zarejestrowano 110 przypadków krztuśca, z najwyższą zachorowalnością w 2012 roku.

2. Najliczniejszą grupę chorych stanowiły nastolatki w wieku 14-16 lat, które przebyły szczepienia przeciwko krztuścowi, obowiązujące do drugiego roku życia.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Atwell JE, Van Otterloo J, Zipprich J* i inni. Nonmedical Vaccine Exemptions and Pertussis in California, 2010. *Pediatrics* 2013; 4: 624-33.
2. *Bellettini CV, Welter de Oliveira A, Tusset C*, i inni. Clinical, laboratorial and radiographic predictors of *Bordetella pertussis* infection. *Rev Paul Pediatr* 2014; 4: 292–8.
3. *Dulny G*. Krztusiec w Polsce. *Epidemiologia i zapobieganie. Przew Lek* 2002; 5: 3: 80-8.
4. *Gonfiantini V, Carloni E, Gesualdo F* i inni. Epidemiology of pertussis in Italy: Disease trends over the last century. *Euro Surveill* 2014; 19: 209-16.
5. *Heininger U, Burckhardt MA*. *Bordetella pertussis* and Concomitant Viral Respiratory Tract Infections Are Rare in Children With Cough Illness. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2011; 8: 640-4.
6. <http://szczepienia.pzh.gov.pl/main.php> (dostęp 06.09.2015)
7. <http://www.who.int/topics/pertussis/en/> (dostęp 06.09.2015)
8. *Kardas-Sobantka D, Gołębiowska M, Libich M, Stryjewska I*. Charakterystyka dzieci z rozpoznaniem zakażeniem pałeczką krztuśca. *Przegl Epidemiol* 2000; 54: 357-65.
9. Komunikat Głównego Inspektora Sanitarnego z dnia 30 października 2014 roku w sprawie Programu Szczepień Ochronnych na rok 2015. Dz. U. Ministra Zdrowia 2015 poz. 72
10. *Lutyńska A, Mosiej E, Zawadka M* i inni. The study of genetic variation of *Bordetella pertussis* strains in the aspect of whooping cough increase rate. *Probl Hig Epidemiol* 2012; 3: 599-604.
11. *Quinn HE, Snelling TL, Macartney K, McIntyre PB*. Duration of Protection After First Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Infants. *Pediatrics* 2014; 133: 513–9.
12. *Sheridan SL, McCall BJ, Davis CA* i inni. Acellular pertussis vaccine effectiveness for children during the 2009-2010 pertussis epidemic in Queensland. *Med J Aust* 2014, 7, 200: 334-8.
13. Stan sanitarny kraju w roku 2013, Główny Inspektor Sanitarny, Warszawa <http://www.gis.gov.pl/> (dostęp 06.09.2015)
14. *Tan T, Trindade E, Skowronski D*. Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 5: 10-18.
15. *Terranella A, Asay GR, Messonnier ML* i inni. Pregnancy Dose Tdap and Postpartum Cocooning to Prevent Infant Pertussis: A Decision Analysis. *Pediatrics* 2013; 131: 1748–56.
16. Ustawa z dnia 5 grudnia 2008 roku „O zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi” Dz.U. 2008 nr 234 poz. 1570
17. *Wang K, Fry NK, Campbell H* i inni. Whooping cough in school age children presenting with persistent cough in UK primary care after introduction of the preschool pertussis booster vaccination: prospective cohort study. *BMJ* 2014, 348: 1- 9.
18. *Zieliński A, Czarkowski M, Sadkowska-Todys M*. Infectious diseases in Poland in 2012. *Przegl Epidemiol* 2014; 68: 177 – 85.

Otrzymano: 10 IV 2016

Adres Autora: 43-300 Bielsko-Biała, ul. Willowa 2, Wydział Nauk o Zdrowiu,  
Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej  
e-mail: [wwaksmanska@ath.edu.pl](mailto:wwaksmanska@ath.edu.pl)



Wstępne badania nad występowaniem chromosomowej integracji  
ludzkiego herpeswirusa typu 6 (CI-HHV-6) wśród polskich biorców  
i dawców krwiotwórczych komórek macierzystych

Prevalence of CI-HHV-6 in patients with hematological diseases  
and healthy donors in Poland – preliminary study

Magdalena Tormanowska<sup>1</sup>, Tomasz Dzieciatkowski<sup>2</sup>, Sylwia Rynans<sup>2</sup>, Maciej Przybylski<sup>2</sup>,  
Anna Gronkowska<sup>1</sup>, Grzegorz W. Basak<sup>1</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>2</sup>, Agnieszka Tomaszewska<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup>Klinika Transplantacji Komórek Krwiotwórczych,  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

---

**Celem pracy było zbadanie częstości występowania chromosomowo zintegrowanego herpeswirusa typu 6 wśród par dawca-biorca przeszczepów allogenicznych komórek krwiotwórczych w Polsce. W tym celu wykorzystano metody serologiczne, służące do określenia występowania specyficznych przeciwciał anti-HHV-6 w klasach IgM i IgG oraz molekularną technikę real-time PCR do pomiaru liczby kopii wirusowego DNA.**

**Słowa kluczowe:** *β-herpeswirusy, zakażenia potransplantacyjne, diagnostyka molekularna, integracja chromosomowa*

---

ABSTRACT

**Introduction:** HHV-6 integrates its genome into telomeres of human chromosomes. Integration can occur in somatic cells or gametes, the latter leading to individuals harboring the HHV-6 genome in every cell. This entity, termed chromosomally integrated HHV-6 (CI-HHV-6), is often mistaken for active infection and treated unnecessarily. The clinical significance of CI-HHV-6 in recipients of alloHSCT is still unknown.

**Methods:** A retrospective review of group of 54 adult donor and recipients pairs of alloHSCT was made. Serum samples taken before transplant were examined for presence

of specific anti-HHV-6 antibodies in IgM and IgG classes and viral DNA. Quantitative real-time PCR assay was also used to determine viral load in alloHSCT recipients in plasma samples.

**Results:** All individuals from studied group have not IgM antibodies against-HHV-6 prior transplantation. Specific IgG-class anti-HHV-6 antibodies were detected in 38 of 54 (70%) donors and in 47 of 54 recipients before HSCT (87%), respectively. High load of HHV-6 DNA ( $>1 \times 10^6$  copies/ml) was detected in plasma samples taken only from one person (1,9%) of the 54 recipients.

**Conclusions:** There is a high frequency specific anti-HHV-6 antibody in studied Polish patients; otherwise CI-HHV-6 was rare detected. Nonetheless, we urge careful observation of individuals with hematological malignances supposed to have CI-HHV-6. Further research on larger study group is needed to determine the clear role of CI-HHV-6 in alloHSCT recipients.

**Key words:**  *$\beta$ -herpesviruses, post-transplant infections, molecular diagnostics, chromosomal integration*

## WSTĘP

Ludzki herpeswirus typu 6 (human herpesvirus 6; HHV-6), należący do podrodziny  *$\beta$ -herpesvirinae*, jest powszechnym latentnym patogenem w populacji na całym świecie (16). Obecnie pod wspólną zwyczajową nazwą HHV-6 występują dwa osobne gatunki wirusa: HHV-6A i HHV-6B (8). U większości ludzi pierwotne zakażenie nimi ma miejsce we wczesnym dzieciństwie i najczęściej jest ono bezobjawowe. U około 30% dzieci występują dolegliwości w postaci wysokiej gorączki, po której pojawiają się zmiany skórne (rumień nagły, gorączka trzydniowa, choroba szóstą) (16). Następnie zakażenie produktywnie przechodzi w stan latencji w śliniankach, monocytach lub też progenitorowych komórkach szpiku (8).

Istotnym klinicznie problemem jest reaktywacja zakażenia HHV-6, głównie gatunku B, u chorych znajdujących się w stanie immunosupresji, np. po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych (alloHSCT) lub narządów (SOT). Objawy mogą być zróżnicowane i różnie nasilone – najczęściej opisywane to: łagodne i przemijające zmiany skórne typu rumienia, gorączka, neuroinfekcje, zapalenie wątroby, limfadenopatia. Reaktywację HHV-6A opisywano głównie u chorych na stwardnienie rozsiane oraz zakażonych HIV (11, 16).

Wykazano również, że ludzki herpeswirus typu 6 może ulegać integracji chromosomowej z genomem człowieka, zwłaszcza w obszarach telomerów (1,7). Częściej chromosomowej integracji ulega HHV-6B (74%) niż HHV-6A (26%) (5,6). Przeciwciała przeciw HHV-6 są wykrywane jedynie u ok. 14% osób ze zintegrowanym chromosomowo herpeswirusem typu 6 (Chromosomally Integrated-HHV-6; CI-HHV-6), natomiast wykrywa się je u 60% badanych bez CI-HHV-6. Identyfikacja CI-HHV-6 u pacjentów poddawanych alloHSCT oraz dawców krwiotwórczych komórek macierzystych jest potencjalnie bardzo istotna z klinicznego punktu widzenia: genom w przypadku CI-HHV-6 u dawcy zostaje przeniesiony w materiale przeszczepowym do organizmu biorcy podczas transplantacji (Hill). U chorych z CI-HHV-6 stwierdza się w ilościowym badaniu techniką real-time PCR (qPCR) bardzo duże liczby kopii HHV-6 DNA/ml, najczęściej



przekraczające  $1 \times 10^6$  kopii/ml (14). Nie zawsze taki stan oznacza reaktywację zakażenia i często pacjenci po HSCT niepotrzebnie otrzymują toksyczne leczenie przeciwwirusowe, podczas gdy rzeczywista przyczyna ich dolegliwości pozostaje niezidentyfikowana. Ponadto opublikowano doniesienia o potencjalnej roli CI-HHV-6 w występowaniu GvHD po alloHSCT, a także możliwość indukowania replikacji HHV-6 u osób z CI-HHV-6 przez niektóre leki, np. biseptol, wankomycynę, sulfasalazynę, fenytoinę, allopurinol, często stosowane u chorych poddanych alloHSCT (6).

Celem pracy było zbadanie częstości występowania chromosomowo zintegrowanego herpeswirusa typu 6 wśród par dawca-biorca przeszczepów allogenicznych komórek krwiotwórczych. W badaniach określano występowanie przeciwciał anti-HHV-6 w klasach IgM i IgG oraz pomiar liczby kopii wirusowego DNA techniką real-time PCR.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań o charakterze retrospektywnym wykorzystano próbki surowicy krwi, pobrane od 54 par dawca-biorca. Badaniom poddano osoby, u których w latach 2013-2015 w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych WUM oraz Klinice Transplantacji Komórek Krwiotwórczych, Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie wykonano zabieg przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych. Materiał badany od dawców komórek krwiotwórczych pobierany był przez zabiegiem przeszczepienia, zaś od biorców przeszczepów trzykrotnie: w dniu 0, +30 oraz +100 po transplantacji.

Oznaczenie swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko HHV-6 w klasach IgG and IgM w próbkach surowic pobranych przed zabiegiem przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych, wykonywane było z użyciem komercyjnego półilościowego testu immunoenzymatycznego (EIA) firmy PanBio® według zaleceń producenta. Wyniki badania przeciwciał w obydwu klasach wyrażane były w jednostkach PanBio (PanBio units; PBU).

Do badania kopijności DNA HHV-6 w próbkach surowicy wykorzystano technikę real-time PCR, opartej na fluorescencyjnej hydrolizującej sondzie typu TaqMan. Izolację DNA z 216 próbek przeprowadzono przy użyciu zestawu High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics®), zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta, zawieszając wyizolowane DNA w końcowej objętości 35 ml buforu elucyjnego. Oznaczenia przeprowadzane były na aparacie LightCycler 96, z użyciem zmodyfikowanej poprzez dodanie kontroli wewnętrznej metody ilościowej qPCR, wykrywającej gen kodujący DNA polimerazę HHV-6, o progu czułości około 50 kopii wirusa na mililitr materiału badanego (5).

## WYNIKI

Przy użyciu opisanych powyżej technik serologicznych u żadnej osoby z grupy badanej nie wykryto przeciwciał anti-HHV-6 w klasie IgM w okresie przed przeszczepieniem. Stwierdzono natomiast występowanie specyficznych przeciwciał klasy IgG, odpowiednio u 38 z 54 (70%) dawców oraz u 47 z 54 (87%) biorców.

Wykorzystując ilościową technikę qPCR wysoką wiremę HHV-6 w surowicy ( $>1 \times 10^6$  kopii/ml) wykryto tylko u jednego (1,9%) biorcy allogenicznych komórek krwiotwórczych. Wynik ten był wspólny dla wszystkich trzech próbek, pobranych w dniach 0, +30 oraz +100 po zabiegu przeszczepienia. U pozostałych biorców przeszczepów DNA

HHV-6 wykryto w próbkach pochodzących od 7 osób (13%), a pobranych w +30 dniu po transplantacji. Badany ilościowo za pomocą metody qPCR poziom kopii wirusa wynosił u nich od 400 do 2300 kopii/ml krwi, co sugeruje raczej reaktywację latentnego wirusa, niż obecność CI-HHV-6.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż genetycznego materiału herpeswirusa typu 6 nie wykryto w żadnej próbce izolowanej od dawcy komórek krwiotwórczych.

## DYSKUSJA

Wszystkie herpeswirusy, w tym i HHV-6, pozostają obecne w organizmie człowieka po zakażeniu pierwotnym do końca życia, jednak zazwyczaj ich cykl replikacyjny znajduje się pod kontrolą układu odpornościowego, zakłóconej w przebiegu immunosupresji u pacjentów po przeszczepieniach narządów unaczynionych oraz komórek krwiotwórczych (6,11,16). Obecność DNA HHV-6 stwierdzano w Polsce zarówno u pacjentów z pierwszej (2), jak i drugiej grupy (4). Do chwili obecnej nie prowadzono jednak w kraju badań nad chromosomalną integracją HHV-6.

Na podstawie uzyskanych wyników badań serologicznych można stwierdzić, że kontakt z herpeswirusem typu 6 jest powszechny w obrębie polskiej populacji. Technika qPCR materiał genetyczny HHV-6 wykryto łącznie u 8 osób (15%), co jest wartością niższą niż w pracach publikowanych poprzednio (3,4). Obserwacja ta nie powinna jednak dziwić, bowiem mediana reaktywacji HHV-6 po transplantacji allogenicznych komórek krwiotwórczych wynosi 17-21 dni (3), zaś w bieżącym badaniu próbki pobierane były w dniu 30 i 100 po przeszczepieniu. Objawy kliniczne obserwowane w tym czasie manifestowały się zazwyczaj gorączką neutropeniczną i/lub wystąpieniem choroby przeszczep przeciw gospodarzowi. Wysoką wiremę HHV-6 ( $>1 \times 10^6$  kopii/ml) stwierdzono natomiast u jednego pacjenta (1,9%) poddanego allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. Częstość ta jest zbliżona do danych opisanych uprzednio, gdyż w zależności od źródła waha się ona od 0,2-0,8% (9,13) do 1,5-3,3% (15). Opierając się na aktualnych wytycznych i danych piśmiennictwa można domniemywać, że wysoki poziom wirerii zaobserwowany u jednego pacjenta, przy jednoczesnym braku manifestacji klinicznej, mógł być związany właśnie z wystąpieniem CI-HHV-6. By mieć pewność zajścia takiego zjawiska, należałoby jednak wykonać badanie za pomocą hybrydyzacji typu FISH. Oznaczenia takie są wprawdzie sugerowane przez inne zespoły badawcze (10,12), lecz przeciwko wprowadzeniu ich do rutynowej diagnostyki przemawia ich czas- i kosztochłonność.

Ze względu na wysoką częstość występowania wirerii HHV-6 wśród osób poddanych zabiegowi przeszczepienia komórek krwiotwórczych, jej potencjalne implikacje kliniczne oraz toksyczność stosowanego leczenia przeciwwirusowego, niezbędne jest wyjaśnienie dokładnej roli integracji chromosomalnej powodowanej przez herpeswirusa typu 6. W tym celu potrzebne są dalsze badania na większej grupie badanej, przy wykorzystaniu oznaczeń serologicznych, ilościowej metody real-time PCR oraz technik hybrydyzacyjnych *in situ*.

**Podziękowania:** Praca współfinansowana ze środków grantu wewnętrznego 1M20/PM11D/14 Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Autorzy jednocześnie wyrażają podziękowania Fundacji na Rzecz Chorych z Chorobami Krwi za możliwość wykorzystania aparatu LC 96 do badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J* i inni. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 5563-8.
2. *Dęborska-Materkowska D, Sadowska A, Matłoz B* i inni. Zakażenie ludzkim wirusem herpes typu 6 u biorcy allogenicznego przeszczepu nerki - opis przypadku. *Przegl Epidemiol* 2006; 60: 141-6.
3. *Dzieciatkowski T, Tomaszewska A, Przybylski M* i inni. Analysis of the shedding of three  $\beta$ -herpesviruses DNA in Polish patients subjected to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: six-year follow up. *J Clin Virol* 2016; 76: 30-5.
4. *Dzieciatkowski T, Przybylski M, Torosian T* i inni. Prevalence of human herpesvirus 6 antibodies and DNA in allogeneic stem cell transplant patients: two-year single centre experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; 56: 1-6.
5. *Dzieciatkowski T, Przybylski M, Gieryńska M* i inni. Wykorzystywanie metody real-time PCR do wykrywania DNA herpeswirusa typu 6. *Med Dośw Mikrobiol* 2008; 60: 259-65.
6. *Hill JA, Zerr DM*. Roseoloviruses in transplant recipients: clinical consequences and prospects for treatment and prevention trials. *Curr Opin Virol* 2014; 9: 53-60.
7. *Kaufner BB, Flamand L*. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Curr Opin Virol* 2014; 9: 111-8.
8. *Krug LT, Pellett PE*. Roseolovirus molecular biology: recent advances. *Curr Opin Virol* 2014; 9: 170-7.
9. *Leong HN, Tuke PW, Tedder RS* i inni. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus
10. *Lohi O, Arola M, Lautenschlager I* i inni. A high circulating copy number of HHV-6 due to chromosomal integration in a child with an acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55: 1236-8.
11. *Osińska E, Tomaszewska A, Dzieciatkowski T*. Zakażenia betaherpeswirusami u osób z niedoborami odporności. *Post Mikrobiol* 2009; 48:267-76.
12. *Strenger V, Aberle SW, Nacheva EP* i inni. Chromosomal integration of the HHV-6 genome in a patient with nodular sclerosis Hodgkin lymphoma. *Brit J Hematol* 2013; 161: 594-5.
13. *Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H* i inni. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomal integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 2004; 73: 467-73.
14. *Ward KN, Leong HN, Nacheva EP* i inni. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2007; 44: 1571-4.
15. *Ward KN*. Human herpesvirus-6 and -7 infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 247-52.
16. *Strenger V, Aberle SW, Nacheva EP* i inni. Chromosomal integration of the HHV-6 genome in a patient with nodular sclerosis Hodgkin lymphoma. *Brit J Hematol* 2013; 161: 594-5.
17. *Zerr DM*. Human herpesvirus 6: a clinical update. *Herpes* 2006;13:20-4.

Otrzymano: 4 V 2016 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
e-mail: [dzieciatkowski@wp.pl](mailto:dzieciatkowski@wp.pl)



Porównanie trzech testów multiplex real-time PCR  
do wykrywania DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2

Comparison of three multiplex real-time PCR assays  
for the detection of herpes simplex viruses type 1 and type 2 DNA

*Anna Majewska, Maciej Przybylski, Paulina Machura, Grażyna Młynarczyk,  
Tomasz Dzieciatkowski*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

---

**Ludzkie wirusy opryszczki typu 1 i typu 2 (HSV-1 i HSV-2) wywołują powszechne na całym świecie zakażenia o różnorodnym przebiegu i nasileniu. Celem pracy było porównanie diagnostycznej wartości zaprojektowanych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM dwóch metod multiplex real-time PCR z użyciem sond typu TaqMan® oraz HybProbes® do wykrywania DNA HSV-1 i HSV-2 z komercyjną metodą opartą na układzie starterów/sond SCORPIONS™.**

**Słowa kluczowe:** *wirusy opryszczki, diagnostyka molekularna, real-time PCR*

---

ABSTRACT

**Introduction:** Herpes simplex viruses type 1 and type 2 (HSV-1 and HSV-2) cause widespread infection worldwide with different course and intensity. Although the disease caused by this viruses mainly concern healthy children and adults, the HSV infections are much more dangerous for people with immunodeficiencies. The aim of this work was to compare the diagnostic value of two qPCR methods for detection HSV-1/2 DNA, based on TaqMan® and HybProbes® chemistry with commercial HSV-1/2 Qual Kit.

**Methods:** DNA from 51 clinical samples was tested for presence of HSV-1/2 sequences on LightCycler 2.0 thermocycler, using two „in-house” developed multiplex real-time PCR assays and commercial test using SCORPIONS™ primers.

**Results:** The results showed high specificity and sensitivity of all molecular biology tests used. Statistically, there was no significant difference in the sensitivity of real-time PCR assays when using TaqMan® and HybProbes® chemistry and when using the commercial SCORPIONS™ based method ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions:** Obtained results show that all tested methods are highly specific and can possibly be used to simultaneously detect and differentiate HSV-1/2 DNA in clinical samples. The high detection rate and short duration of qPCR assays has great importance for immunocompromised patients where quick application of effective and safe treatment is necessary. It is also important in the event of amorphous form of the infection and the occurrence of nonspecific and generalized symptoms.

**Key words:** *herpes simplex viruses, molecular diagnostics, real-time PCR*

## WSTĘP

Zakażenia wirusem opryszczki typu 1 (HSV-1, HHV-1) oraz typu 2 (HSV-2, HHV-2) należą do chorób wirusowych występujących powszechnie na całym świecie (7,17). Do infekcji dochodzi zazwyczaj w wyniku bezpośredniego kontaktu, a wrotami zakażenia są uszkodzone mechanicznie błony śluzowe lub skóra. HSV-1 jest najczęściej wiązany z zakażeniami w obrębie jamy ustnej, takimi jak: zmiany pęcherzykowe okolic ust i innych części twarzy, zapalenia mózgu (7,17) czy uogólnione infekcje u osób z zaburzeniami odporności (7), natomiast HSV-2 uważa się za czynnik etiologiczny zakażeń skóry i błon śluzowych, zlokalizowanych w obrębie narządów płciowych i/lub okolicy okołoodbytniczej (5,17). Wirusy opryszczki są także istotnym czynnikiem zakaźnym wielu neuroinfekcji, które obserwuje się zarówno wśród osób immunokompetentnych (6), jak i pacjentów z niedoborami immunologicznymi (9). Istotna jest również obserwacja, że HSV-2 może być przyczyną tych zakażeń ośrodkowego układu nerwowego osób dorosłych, które wcześniej uważano za wywoływane przez HSV-1 (16).

Obecnie do wykrywania i różnicowania zakażeń o etiologii opryszczkowej powszechnie stosuje się łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) oraz jej modyfikację, real-time PCR (qPCR), umożliwiającą także oznaczenia ilościowe (2,8). Ta ostatnia technika, ze względu na swą niezwykle czułość oraz szybkość wykonania znajduje zastosowanie zwłaszcza w diagnostyce neuroinfekcji oraz przy monitorowaniu skuteczności terapii przeciwwirusowej (14).

Metoda real-time PCR umożliwia zastosowanie różnych systemów wykrywania genetycznego materiału patogenów. Najczęściej stosowane są sondy hydrolizujące typu TaqMan<sup>®</sup>, które wyznakowane są na końcu 5' fluorochromem reporterowym, zaś na końcu 3' wygaszaczem. Bliska obecność wygaszacza w natywnej formie sondy pochłania energię fluorescencji barwnika reporterowego. Jeżeli w mieszaninie reakcyjnej znajduje się swoisty produkt PCR, następuje hybrydyzacja sondy do komplementarnej nici DNA. Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez zmodyfikowaną polimerazę Taq o własnościach 5'-egzonukleolitycznych, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powoduje emisję fluorescencji, której natężenie mierzone jest po każdym cyklu reakcji (13).

System sond hybrydyzacyjnych HybProbes<sup>®</sup>, oparty jest na użyciu dwóch sond oligonukleotydowych, hybrydujących jedna za drugą do sąsiadujących sekwencji w matrycowym DNA. Pierwsza z sond znakowana jest na końcu 3' fluoresceiną (FITC), zaś druga na końcu 5' jednym z barwników z serii LightCycler Red. Gdy obydwa

fluorofory znajdują się w bliskim sąsiedztwie a donor zostanie wzbudzony przez zewnętrzne źródło światła, następuje między nimi transfer energii i fluorescencja (FRET). Układ taki charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością, jednak ze względu na kłopotliwy proces optymalizacji warunków reakcji jest stosunkowo rzadko wykorzystywany w testach komercyjnych (13).

Rzadziej używany jest natomiast układ starterów/sond typu SCORPIONS™, które mają odpowiednio wyznakowane wygaszaczem i reporterem komplementarne do siebie końce 3' i 5', które składają się ze specyficznej sekwencji sondy i tzw. struktury spinki, której część osiowa zawiera odpowiadające sobie komplementarne sekwencje. Struktura ta jest utrzymywana w stanie niehybrydowanym przez sondę. Na końcu 5' znajduje się fluorochrom, który tłumiony jest przez wygaszacz na końcu 3'. Koniec 3' pętli połączony jest z końcem 5' specyficznego startera przez monomer nieulegający amplifikacji (często glikol heksetylenowy). Uniemożliwia to powielanie sekwencji sondy podczas etapu polimeryzacji i otworzenie struktury spinki, gdy brak jest specyficznej sekwencji docelowej. Po wydłużeniu startera, występująca w pętli sondy specyficzna sekwencja zostaje związana z amplikonem, co powoduje otwarcie spinki. Poprzez zmianę konformacji sondy, dochodzi do zwiększenia się odległości pomiędzy barwnikiem a cząsteczką wygaszającą, co generuje gwałtowny i silny sygnał fluorescencji (12).

Celem pracy było porównanie diagnostycznej wartości dwóch zaprojektowanych uprzednio w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM metod real-time PCR z użyciem sond typu TaqMan® oraz HybProbes® do wykrywania DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2 z komercyjnym testem opartym na starterach/sondach SCORPIONS™.

## MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano 51 klinicznych próbek pochodzących z kolekcji Pracowni Wirusologii Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Pochodziły one od pacjentów leczonych ambulatoryjnie w Klinice Dermatologii i Wenerologii oraz Poradni Ginekologiczno-Położniczej Szpitala Klinicznego im. Dzieciątka Jezus i w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych WUM. Badaniom poddano następujące materiały: surowicę krwi (6 próbek), płyn ze zmian pęcherzykowych (2 próbki) oraz wymazy ze zmian bezpośrednich (43 próbek).

DNA całkowite, wykorzystywane do oznaczeń, izolowano przy użyciu komercyjnego zestawu High Pure Viral Nucleic Acid Kit® (Roche Diagnostics). Izolację przeprowadzono z objętości 200 µl odpowiednich materiałów, zgodnie z instrukcją producenta, zawieszając wyizolowane DNA w końcowej objętości 35 µl buforu elucyjnego.

W badaniach molekularnych techniką multiplex real-time PCR wykorzystano metody opisane uprzednio, oparte na sondach hydrolizujących typu TaqMan® (10) oraz układzie sond hybrydujących HybProbes® (1). Jako metody odniesienia użyto komercyjnego testu jakościowego HSV-1/2 Qual Kit (Roche), bazującego na starterach/sondach SCORPIONS™. Wszystkie oznaczenia przeprowadzane były na aparacie LightCycler 2.0 (Roche).

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 10 (StatSoft Inc.).

## WYNIKI

Wśród 51 próbek przebadanych techniką multiplex real-time PCR, opartą na hydrolizujących sondach typu TaqMan®, 45 próbek było pozytywnych dla HSV-1, zaś 4 w kierunku HSV-2. Jedna próbka badana była pozytywna zarówno dla HSV-1, jak i HSV-2. Dwie próbki okazały się negatywne zarówno dla wirusa opryszczki typu 1 oraz typu 2. Podobne wyniki uzyskano przy użyciu metody wykorzystującej hydrolizujące sondy typu HybProbes® oraz komercyjnej metody odniesienia, opartej na układzie starterów/sond SCORPIONS™ (Tab. I).

W celu porównania czułości zastosowanych testów molekularnych przeanalizowano uzyskane wyniki badań pod kątem wartości numeru cyklu reakcji, przy którym fluorescencja próbki odrywa się wykładniczo od poziomu tła (ang. *Crossing point*; *Cp*). Analiza statystyczna wartości *Cp* uzyskanych za pomocą testów z użyciem hydrolizujących sond typu TaqMan®, sond typu HybProbes® oraz starterów/sond SCORPIONS™ nie wykazała statystycznie znamiennych różnic w czułości wszystkich trzech zastosowanych układów sond fluorescencyjnych (test t-Studenta;  $P > 0,05$ ), choć obserwowane wartości *Cp* były zazwyczaj nieznacznie niższe przy użyciu metody wykorzystującej układ sond hybrydujących HybProbes® (Tab. I). Obserwacja ta sugerować może zwiększoną czułość powyższej techniki, zwłaszcza w próbkach zawierających niewielkie ilości wirusowego DNA.

Tabela I. Wyniki oznaczeń w kierunku zakażenia HSV-1/2 uzyskanych z użyciem technik multiplex real-time PCR wykorzystujących różne systemy reporterowe. W nawiasach podane wartości *Crossing point* (*Cp*) uzyskane dla poszczególnych próbek.

Materiał badany	Wynik uzyskany za pomocą real-time PCR TaqMan® ( <i>Cp</i> )	Wynik uzyskany za pomocą real-time PCR HybProbes® ( <i>Cp</i> )	Wynik uzyskany za pomocą real-time PCR SCORPIONS™ ( <i>Cp</i> )
surowica 1	HSV-1 (31,47)	HSV-1 (30,11)	HSV-1 (31,83)
surowica 2	HSV-1 (31,95)	HSV-1 (30,94)	HSV-1 (31,99)
surowica 3	HSV-1 (33,56)	HSV-1 (32,76)	HSV-1 (33,03)
surowica 4	HSV-1 (29,12)	HSV-1 (28,52)	HSV-1 (28,79)
surowica 4	HSV-1 (32,73)	HSV-1 (32,29)	HSV-1 (33,00)
surowica 6	HSV-1 (31,42)	HSV-1 (30,56)	HSV-1 (30,71)
płyn 1	HSV-1 (15,01)	HSV-1 (14,03)	HSV-1 (14,81)
płyn 2	HSV-1 (12,73)	HSV-1 (11,29)	HSV-1 (13,03)
wymaz 1	HSV-1 (21,73)/ HSV-2 (28,02)	HSV-1 (20,42)/ HSV-2 (27,51)	HSV-1 (21,87)/ HSV-2 (27,94)
wymaz 2	HSV-1 (31,42)	HSV-1 (30,56)	HSV-1 (30,71)
wymaz 3	HSV-1 (31,07)	HSV-1 (30,68)	HSV-1 (31,02)
wymaz 4	HSV-1 (30,91)	HSV-1 (30,49)	HSV-1 (34,00)
wymaz 5	HSV-1 (27,11)	HSV-1 (26,67)	HSV-1 (26,41)
wymaz 6	HSV-1 (30,17)	HSV-1 (28,11)	HSV-1 (28,34)
wymaz 7	HSV-1 (33,21)	HSV-1 (29,67)	HSV-1 (30,18)
wymaz 8	HSV-1 (27,28)	HSV-1 (26,31)	HSV-1 (26,21)
wymaz 9	HSV-1 (35,00)	HSV-1 (30,37)	HSV-1 (32,03)
wymaz 10	HSV-2 (33,70)	HSV-2 (32,39)	HSV-2 (34,01)



Cd. Tabeli I. Wyniki oznaczeń w kierunku zakażenia HSV-1/2 uzyskanych z użyciem technik multiplex real-time PCR wykorzystujących różne systemy reporterowe. W nawiasach podane wartości *Crossing point* (*Cp*) uzyskane dla poszczególnych próbek.

Materiał badany	Wynik uzyskany za pomocą real-time PCR TaqMan® ( <i>Cp</i> )	Wynik uzyskany za pomocą real-time PCR HybProbes® ( <i>Cp</i> )	Wynik uzyskany za pomocą real-time PCR SCORPIONS™ ( <i>Cp</i> )
wymaz 11	HSV-1 (35,09)	HSV-1 (33,22)	HSV-1 (34,21)
wymaz 12	HSV-1 (29,47)	HSV-1 (29,05)	HSV-1 (30,11)
wymaz 13	HSV-1 (35,14)	HSV-1 (32,41)	HSV-1 (33,27)
wymaz 14	HSV-1 (30,36)	HSV-1 (27,39)	HSV-1 (27,81)
wymaz 15	HSV-1 (34,78)	HSV-1 (35,06)	HSV-1 (35,00)
wymaz 16	HSV-1 (35,25)	HSV-1 (34,19)	HSV-1 (32,80)
wymaz 17	HSV-1 (35,00)	HSV-1 (35,21)	HSV-1 (34,65)
wymaz 18	HSV-1 (30,18)	HSV-1 (28,76)	HSV-1 (31,34)
wymaz 19	HSV-1 (33,27)	HSV-1 (31,56)	HSV-1 (33,12)
wymaz 20	HSV-2 (29,14)	HSV-2 (26,73)	HSV-2 (27,43)
wymaz 21	HSV-1 (33,02)	HSV-1 (31,07)	HSV-1 (33,36)
wymaz 22	HSV-1 (35,06)	HSV-1 (33,71)	HSV-1 (33,65)
wymaz 23	HSV-1 (33,84)	HSV-1 (32,97)	HSV-1 (33,07)
wymaz 24	HSV-1 (33,97)	HSV-1 (32,33)	HSV-1 (33,13)
wymaz 25	HSV-1 (32,75)	HSV-1 (31,83)	HSV-1 (32,24)
wymaz 26	HSV-1 (28,92)	HSV-1 (26,13)	HSV-1 (27,01)
wymaz 27	HSV-1 (34,12)	HSV-1 (33,32)	HSV-1 (33,57)
wymaz 28	HSV-1 (34,22)	HSV-1 (33,11)	HSV-1 (34,02)
wymaz 29	HSV-1 (31,58)	HSV-1 (30,48)	HSV-1 (30,79)
wymaz 30	HSV-1 (28,85)	HSV-1 (27,91)	HSV-1 (26,66)
wymaz 31	HSV-1 (34,48)	HSV-1 (33,13)	HSV-1 (34,03)
wymaz 32	HSV-1 (34,22)	HSV-1 (33,26)	HSV-1 (33,71)
wymaz 33	HSV-1 (32,28)	HSV-1 (34,10)	HSV-1 (35,07)
wymaz 34	HSV-1 (31,26)	HSV-1 (30,17)	HSV-1 (32,06)
wymaz 35	HSV-2 (19,85)	HSV-2 (17,13)	HSV-2 (19,49)
wymaz 36	HSV-1 (33,23)	HSV-1 (32,87)	HSV-1 (31,56)
wymaz 37	HSV-1 (34,01)	HSV-1 (33,16)	HSV-1 (33,09)
wymaz 38	HSV-1 (35,62)	HSV-1 (33,21)	HSV-1 (33,19)
wymaz 39	HSV-1 (34,22)	HSV-1 (32,78)	HSV-1 (33,01)
wymaz 40	HSV-1 (32,49)	HSV-1 (32,18)	HSV-1 (30,30)
wymaz 41	HSV-1 (34,81)	HSV-1 (32,14)	HSV-1 (33,58)
wymaz 42	HSV-1 (29,36)	HSV-1 (26,05)	HSV-1 (28,88)
wymaz 43	HSV-2 (27,48)	HSV-2 (26,71)	HSV-2 (25,21)

## DYSKUSJA

Wirusy opryszczki pospolitej typu 1 i 2 wywołują powszechne i różnorodne zakażenia wśród dzieci i dorosłych, zarówno u osób immunokompetentnych, jak i u pacjentów z obniżoną odpornością (7,17). Dodatkowym problemem jest zdolność uaktywniania się wirusa ze stanu latencji pod wpływem różnych bodźców lokalnych, bądź systemowych (17).

Rozpoznanie zakażeń o etiologii opryszczkowej nie jest łatwe, a sama diagnoza kliniczna jest zwykle niewystarczająca, co może prowadzić do wielu błędów, gdyż zakażenia tego typu mogą być mylone z innymi infekcjami wirusowymi, bakteryjnymi, a nawet grzybiczymi (4).

Wzrost zapotrzebowania na opracowanie szybkich i czułych metod stwierdzających zakażenia wywołane przez wirusy opryszczki pospolitej spowodowany jest nie tylko zwiększeniem liczby pacjentów z obniżoną odpornością, u których HSV-1 jak i HSV-2 są odpowiedzialne za znaczną zachorowalność i śmiertelność, ale również koniecznością szybkiego zastosowania skutecznego leczenia (7,8). W przypadku wykrywania atypowych zmian wywołanych przez HSV-1/2, technika PCR wykazuje osiem razy większą czułość niż hodowle komórkowe. Jest również techniką szybszą oraz mniej pracochłonną (2,14). Jednak dużą zaletą hodowli komórkowych jest możliwość stwierdzenia wrażliwości szczepu wirusowego na określone chemioterapeutyki (2).

Łańcuchowa reakcja polimerazy w diagnostyce zakażeń opryszczkowych wyparła również inne klasyczne metody, takie jak na przykład metody serologiczne. Miało to istotne znaczenie szczególnie w przypadku pacjentów z obniżoną odpornością, u których zmniejszona lub stłumiona odpowiedź immunologiczna może nie odzwierciedlać występowania pierwotnego lub wtórnego zakażenia herpeswirusami. Dodatkową wadą metod serologicznych jest fakt, iż nie informują one o lokalizacji zakażenia (16). Wprowadzenie w ostatnich latach metody real-time PCR pozwoliło na uzyskanie wiarygodnych wyników, dzięki możliwości dokonania zarówno analizy jakościowej jak i ilościowej w znacznie krótszym czasie (3,13). Ilościowe określenie kopii DNA w badanej próbce ma ogromne znaczenie przy badaniu „obciążenia” wirusem (ang. *viral load*), co daje możliwość monitorowania pacjentów podczas zastosowanej terapii przeciwwirusowej (3,13,14).

Wykorzystane w pracy metody multiplex real-time PCR oparte na sondach hydrolizujących typu TaqMan® (10), sondach hybrydujących HybProbes® (1) oraz układzie starterów/sond SCORPIONS™ wykazały się podobną czułością i wartością diagnostyczną. Wśród wszystkich przebadanych próbek w jednym materiale badanym wykryto DNA zarówno HSV-1 jak i HSV-2, co świadczy o koinfekcji pacjenta dwoma typami wirusa. Niewielka ilość wyników dodatnich w kierunku wirusa opryszczki typu 2 potwierdza, że głównym etiologicznym czynnikiem zakażeń narządów płciowych i okolicy okołodbytniczej na terenie Polski jest HSV-1 (15,11). Otrzymane wyniki wskazują, że każdy z badanych testów qPCR pozwala na wykrycie i różnicowanie wirusów opryszczki pospolitej w różnym materiale klinicznym. Jednakże obydwie metody zaprojektowane „*in-house*” umożliwiają łatwe ich dostosowanie do wariantu ilościowego, czego nie daje użyty w badaniu test komercyjny. Możliwość samodzielnego zaprojektowania i syntezy starterów oraz sond znacznie obniża także koszty potencjalnego oznaczenia.

## PIŚMIENNICTWO

1. Chudzik E, Karabin K, Dzieciatkowski T i inni. Wykrywanie oraz różnicowanie wirusów opryszczki typu 1 i 2 metodą real-time PCR z wykorzystaniem sond HybProbe. *Med Dośw Mikrobiol* 2010; 62: 255-62.

2. *Costello MT, Sabatini L, Yungbluth P.* Herpes simplex virus infections and current methods for laboratory detection. *Clin Microbiol Newsl* 2006; 28: 185-92.
3. *Drago L, Lombardi A, Vecchi E* i inni. Comparison of nested PCR and real time PCR of herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 55
4. *Hensleigh PA, Andrews WW, Brown Z* i inni. Genital herpes during pregnancy: inability to distinguish primary and recurrent infections clinically. *Obstet Gynecol* 1997; 89: 891-5.
5. *Hofstetter AM, Rosenthal SL, Stanberry LR.* Current thinking on genital herpes. *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27: 75-83.
6. *Huppatz C, Durrheim DN, Levi C* i inni. Etiology of encephalitis in Australia, 1990-2007. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1359-65.
7. *Karabin K, Chudzik E, Dzieciatkowski T.* Zakażenia alfa herpeswirusami u pacjentów z upośledzeniem odporności. *Post Mikrobiol* 2010; 49: 97-104.
8. *Kawada J, Kimura H, Ito Y* i inni. Comparison of real-time PCR and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 411-5.
9. *Li JZ, Sax PE.* HSV-1 encephalitis complicated by cerebral hemorrhage in an HIV-positive person. *AIDS Read* 2009; 19: 153-5.
10. *Machura P, Górka E, Młynarczyk-Bonikowska B* i inni. Wykorzystanie nowej techniki multiplex real-time PCR do wykrywania i różnicowania DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2. *Med Dośw Mikrobiol* 2015; 67: 125-32.
11. *Majewska A, Kilijańczyk M, Gajewska M* i inni. Identyfikacja wirusów opryszczki pospolitej w materiale pobranym z błony śluzowej narządów płciowych od pacjentek poradni ginekologicznej przy I Katedrze i Klinice Położnictwa i Ginekologii WUM w Warszawie. *Ginekol Prakt* 2009; 17: 17-20.
12. *Radwan M, Jonszta D, Kosz-Vnenchak M.* Metoda PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) - wyzwania i perspektywy. *Diagnosta Lab* 2008; 6: 10-7.
13. *Rynans S, Walter de Walthoffen S, Dzieciatkowski T* i inni. Zastosowanie techniki real-time PCR w wirusologii. *Post Mikrobiol* 2015; 54: 75-82.
14. *Schloss L, Falk KI, Skoog E* i inni. Monitoring of herpes simplex virus DNA types 1 and 2 viral load in cerebrospinal fluid by real-time PCR in patients with herpes simplex encephalitis. *J Med Virol* 2009; 81: 1432-7.
15. *Smith JS, Rosinska M, Trzcinska A* i inni. Type specific seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 in four geographical regions of Poland. *Sex Transm Infect* 2006; 82: 159-63.
16. *Tang JW, Coward LJ, Davies NWS* i inni. Brain stem encephalitis caused by primary herpes simplex 2 infection in a young woman. *J Neurol Neurosurg Psych* 2003; 74: 1323-5.
17. *Whitley RJ, Roizman B.* Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513-8.

Otrzymano: 6 V 2016 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny



## Identyfikacja grzybów drożdżopodobnych izolowanych z dróg rodnych kobiet z wykorzystaniem spektrometrii mas typu MALDI-TOF

### Identification of yeasts isolated from the genital tract of women by mass spectrometry MALDI-TOF

Anna Kawalec<sup>1</sup>, Anna Białecka<sup>2</sup>, Andrzej Kasproicz<sup>2</sup>, Wiesław Barabasz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja, w Krakowie

<sup>2</sup>Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra, w Krakowie

---

**Poddano identyfikacji 484 szczepy grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych w 2015 roku z dróg rodnych pacjentek w wieku rozrodczym, u których zlecono diagnostykę mikologiczną w laboratorium Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie (CBMiA). Identyfikację szczepów wykonano techniką spektrometrii masowej typu MALDI – TOF (z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu). Wszystkie badane szczepy na podstawie analizy białek rybosomalnych zostały prawidłowo zidentyfikowane na poziomie gatunku.**

**Słowa kluczowe:** zakażenia grzybicze pochwy, *Candida sp.*, *Candida non-albicans*, spektrometria mas typu MALDI-TOF

---

#### ABSTRACT

**Introduction:** A fungal infection of vagina is one of the most common gynecological problems of women of childbearing age. There has been a gradual increase in yeast-like fungi which are problematic to identify. There is thus a need for searching new identification methods, which would allow for fast recognition and selection of the proper course of treatment. The aim of study was to evaluate the usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry technique in the diagnosis of pathogenic yeast-like fungi isolated from the genital tract of women.

**Methods:** There were identified 484 yeast-like fungi strains isolated from the genital tract of patients treated at Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra in Cracow (CBMiA) in the age group 20 - 50. The material was analyzed using streak plating on the culture medium: Sabouraud agar (CBMiA) and chromogenic media chromID Candida (bioMérieux). The strains were identified using MALDI-TOF mass

spectrometer (MALDI Biotyper Microflex™ Series, Bruker Daltonics, Germany) operating as IVD (In Vitro Diagnostic). The procedure of proteins extraction with the use of ethanol and formic acid was used.

**Results:** All 484 yeast-like fungi strains isolated from the genital tract of women were correctly identified to the species level.

**Conclusions:** MALDI-TOF mass spectrometry method may be successfully used for routine identification of yeast-like fungi and in particular the strains of non-albicans *Candida*, which have a lower susceptibility to antifungal agents.

**Key words:** fungal infections of the vagina, *Candida sp.*, *Candida non-albicans*, MALDI-TOF mass spectrometer

## WSTĘP

Zakażenie grzybicze pochwy (kandydoza pochwy, *vulvovaginal candidosis* –VVC) jest jedną z najczęstszych dolegliwości ginekologicznych u kobiet w wieku rozrodczym, gdzie częstość występowania, w zależności od badanej populacji, waha się od 15 do 30% (2, 3, 16). Zakażenie co najmniej raz w życiu rozwija się u 70-75% kobiet (23). Według literatury większość grzybiczych zakażeń pochwy wywoływana jest przez grzyby należące do rodzaju *Candida* – głównie przez gatunek *Candida albicans*, ale coraz częściej także przez inne gatunki *Candida* zwane *Candida non-albicans* (m.in. *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) oraz *Saccharomyces cerevisiae* (4, 22).

Kandydoza charakteryzuje się występowaniem gęstych, serowo-białych upławów, świądem sromu oraz bolesnością i pieczeniem, zwłaszcza po stosunku. Najczęstszą drogą zakażenia grzybami drożdżopodobnymi jest kontakt płciowy, a wrotami skóra i błona śluzowa. Stosowanie wielokrotnej antybiotykoterapii, doustnych środków antykoncepcyjnych, hormonalnej terapii, wkładek wewnątrzmacicznych zwiększa ryzyko rozwoju VVC (4, 15). Do nawrotu zakażenia dochodzi bardzo często pod koniec II fazy cyklu, kiedy stężenie progesteronu osiąga maksymalne wartości, co ze względu na jego immunosupresyjne działanie, osłabia odporność typu komórkowego. Potwierdzeniem tego, może być także obserwowana zwiększona zachorowalność w trakcie ciąży, wynosząca w I trymestrze 10 proc., zaś w III od 23 do 55 procent (5).

Brak podjęcia odpowiedniej diagnostyki i leczenia grzybiczych zakażeń pochwy pociąga za sobą zwiększone ryzyko infekcji cewki moczowej i pęcherza moczowego, co powoduje objawy dyzuryczne oraz pollakiurię (3). U osób z obniżoną odpornością lub leczonych wysokimi dawkami antybiotyków o szerokim spektrum działania może doprowadzić do zakażenia rozsianego (6).

Szczepy grzybów drożdżopodobnych izolowane z dróg rodnych znacząco różnią się wrażliwością na leki przeciwgrzybicze, dlatego Polskie Towarzystwo Ginekologiczne rekomenduje pobieranie materiału z miejsc zmienionych chorobowo i poddawanie go identyfikacji mikologicznej oraz badaniu lekowrażliwości, zwłaszcza w przypadkach nawrotowego grzybiczego zapalenia pochwy i sromu (RVVC - *Recurrent Vulvovaginal Candidosis*) (18). Aktualnie stosowane metody fenotypowe identyfikacji grzybów drożdżopodobnych są czasochłonne, gdyż identyfikacja szczepu trwa nawet ponad 48

godzin. Ponadto w laboratoriach obserwuje się stopniowy wzrost odsetka izolatów grzybów drożdżopodobnych sprawiających trudności w identyfikacji przy użyciu podłoży chromogennych oraz automatycznych systemów do identyfikacji. Istnieje więc potrzeba poszukiwania nowych metod identyfikacji, które pozwoliłyby na szybką identyfikację i dobór właściwego toku leczenia.

W laboratorium CBMiA podjęto próbę identyfikacji grzybów techniką spektrometrii mas typu MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu. Celem pracy była ocena przydatności techniki MALDI-TOF w procesie diagnostycznym chorobotwórczych szczepów grzybów drożdżopodobnych izolowanych z dróg rodnych kobiet.

## MATERIAŁ I METODY

Identyfikacji poddano 484 szczepy grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych z dróg rodnych pacjentek CBMiA w grupie wiekowej 20 – 50 lat, skierowanych przez lekarzy ginekologów na badania mikologiczne pochwy ze wskazań klinicznych.

Pełne badanie mikologiczne drożdżaków wykonano według schematu diagnostycznego przedstawionego na rycinie nr 1. Wymazy pobierano od pacjentek z założonym wziernikiem, przez który wprowadzano wymazówki i pobierano treść pochwową z tylnego sklepienia pochwy. Materiał z jednej wymazówki pozwolił na wykonanie preparatu barwionego metodą Grama przy zastosowaniu automatycznego systemu barwienia PREVI™ (bioMérieux), natomiast z drugiej i trzeciej wymazówki wykonywane były posiewy redukcyjne na podłoża hodowlane. Z pozostałości wydzieliny treści pochwowej na wzierniku wykonywano pomiar pH wydzieliny pochwowej przy użyciu pasków wskaźnikowych o zakresie pH 2,0-9,0 (MColorpHast™, Merck). Materiał posiewano redukcyjnie na podłoża hodowlane w kierunku bakterii tlenowych na agar tryptozowo-sojowy TSA (Tryptic Soy Agar) z dodatkiem 5% krwi baraniej (CBMiA) i inkubowano 24 godziny w warunkach tlenowych w temperaturze 35°C. W kierunku grzybów drożdżopodobnych wymazy posiewano na agar Sabourauda (CBMiA) oraz podłoże chromogenne chromID Candida (bioMérieux) i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 35°C, w warunkach tlenowych. Uzyskane izolaty identyfikowano wstępnie na podstawie zabarwienia kolonii: kolonie *Candida albicans* barwiły się na kolor niebieski, dzięki specyficznej hydrolizie substratu chromogennego przez heksoaminidazę, natomiast hydroliza drugiego substratu dając różowe zabarwienie pozwala wyłącznie na wstępne różnicowanie *C. tropicalis*, *C. kefyr* i *C. lusitaniae*. Natomiast kolonie białe ukierunkowywały na wstępną identyfikację grzybów filamentujących, wymagającą dalszej kontynuacji w określeniu przynależności gatunkowej. W laboratorium CBMiA rutynowo identyfikacje grzybów drożdżopodobnych wykonuje się przy użyciu podłoży chromogennych chromID Candida (bioMérieux) i automatycznego systemu VITEK 2 firmy bioMérieux. W prowadzonym badaniu podjęto próbę identyfikacji grzybów nową metodą identyfikacji – spektrometrii mas typu MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu. Badania wykonywane były w spektrometrze mas MALDI Biotyper, seria Microflex™, firmy Bruker Daltonics (Niemcy), pracującego w trybie IVD (In Vitro Diagnostic). W badaniu zastosowano procedurę ekstrakcji białek z użyciem etanolu i kwasu

mrówkowego. W tym celu pojedynczą kolonię grzybów drożdżopodobnych zawieszano w 300  $\mu$ l wody dejonizowanej (Water LC-MS CHROMASOLV, Fluka), wytrząsano, po czym dodawano 900  $\mu$ l etanolu (etylowy alkohol bezwodny 99,8% CZDA, POCH) i dokładnie mieszano. Kolejną próbkę wirowano przy 13 000 obr/min przez 2 min (wirówka MiniSpin, Eppendorf), zdekantowano supernatant, ponownie odwirowano i usunięto pozostały etanol, pozostawiono grudkę nasączoną etanolem do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez dwie minuty. Następnie dodawano od 1 do 80  $\mu$ l w zależności od wielkości izolowanego materiału 70% kwasu mrówkowego (Trifluoroacetic acid, Reagent Plus 99%, Sigma – Aldrich) do osadu i mieszano, kolejno dodawano od 1 do 80  $\mu$ l acetonitrylu (Acetonitryl, Sigma – Aldrich) w zależności od wielkości izolowanego materiału i ponownie mieszano. Po odwirowaniu próbek (13 000 obr/min. przez 2 minuty) nakładano po 1  $\mu$ l supernatantu na 96-dółkową płytkę MALDI i pozostawiono do wyschnięcia, następnie nakładano 1  $\mu$ l roztworu matrix HCCA (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksy-cynamonowy, firmy Bruker Daltonics). Przygotowaną według powyżej procedury płytkę wkładano do komory spektrometru mas MALDI Biotyper, gdzie białka grzybów drożdżopodobnych pod wpływem promieni lasera poddawane były desorpcji i jonizacji, następnie zjonizowane peptydy przemieszczane były w polu elektrycznym, gdzie ulegały rozdziałowi według masy cząsteczkowej, ładunku oraz odmiennego czasu przelotu. Końcowym etapem było generowanie profili jonów białkowych i peptydowych izolatów oraz ich automatyczne porównywanie za pomocą platformy IVD MALDI Biotyper zawierającej bibliotekę widm referencyjnych. Identyfikacja polegała na ustanowieniu wiarygodnej teoretycznej korelacji pomiędzy uzyskanym widmem i widmem odniesienia w formie biostatycznego poziomu ufności. Zgodność widm była przedstawiana w formie wartości numerycznej („log (wartość)” = wartość punktacji) pomiędzy 0 a 3. Wynik identyfikacji był prawdopodobny, gdy  $\log(\text{wartość}) \geq 2,0$ . Wskaźnik punktowy w zakresie: 2,300- 3,000 wskazywał na wiarygodną identyfikację grzybów do poziomu gatunku; 2,000- 2,299 wskazywał na wiarygodną identyfikację grzybów do poziomu rodzaju oraz prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu gatunku; 1,700 – 1,999 wskazywał prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu rodzaju; 0 – 1,699 wskazywała niewiarygodny wynik identyfikacji (8).

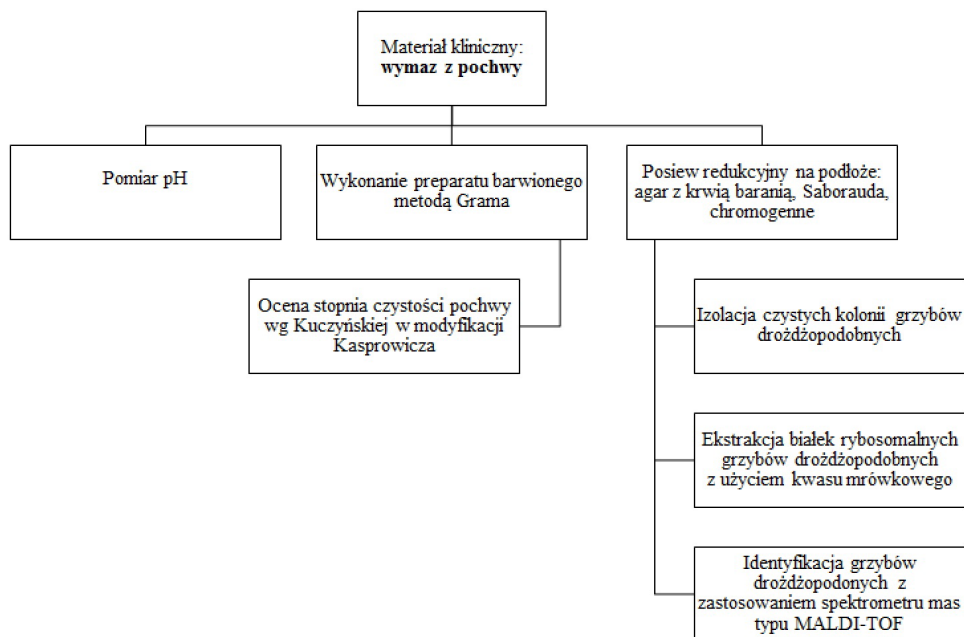
Przed każdą serią wykonywanych pomiarów przeprowadzano walidację potwierdzającą prawidłowe działanie systemu IVD MALDI Biotyper. Pomiar walidacyjny wymagał przygotowania standardu IVD BTS (IVD Bacterial Test Standard, Bruker Daltonik) w jednej z pozycji na płytce MALDI, a następnie wykonywany był kilkukrotny pomiar z zastosowaniem zautomatyzowanej metody. Uzyskane widma były następnie sprawdzane z uwzględnieniem wskaźników jakości: czy wszystkie pliki kalibracyjne znajdują się w określonym zakresie masy, czy mają odpowiednią rozdzielczość, czy najwyższe pliki widma nie są wysyczone oraz czy linia podstawowa widma w obszarze niższej masy pozostaje niska.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Otrzymane profile białek rybosomalnych (spektrogramy) badanych grzybów drożdżopodobnych zostały automatycznie porównane za pomocą oprogramowania MALDI-Biotyper 2.3 (Bruker) z wzorcowymi profilami referencyjnych drobnoustrojów – biblioteką liczącą 81 szczepów *Candida sp.* (MBT DB-5627, Bruker). Wszystkie 484 szczepy grzybów drożdżopodobnych, wyizolowane z dróg rodnych kobiet, zostały



prawidłowo zidentyfikowane do poziomu gatunku. Prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji wyrażane w postaci wskaźnika punktowego wynosiło 74,6% dla zakresu  $\geq 2,300$ , 24,8% dla  $\geq 2,000$ , 0,6% dla  $\geq 1,800$ . Przedstawione wyniki wskazują, na wysoki stopień wiarygodności wyników identyfikacji grzybów drożdżopodobnych techniką spektrometrii mas typu MALDI-TOF.

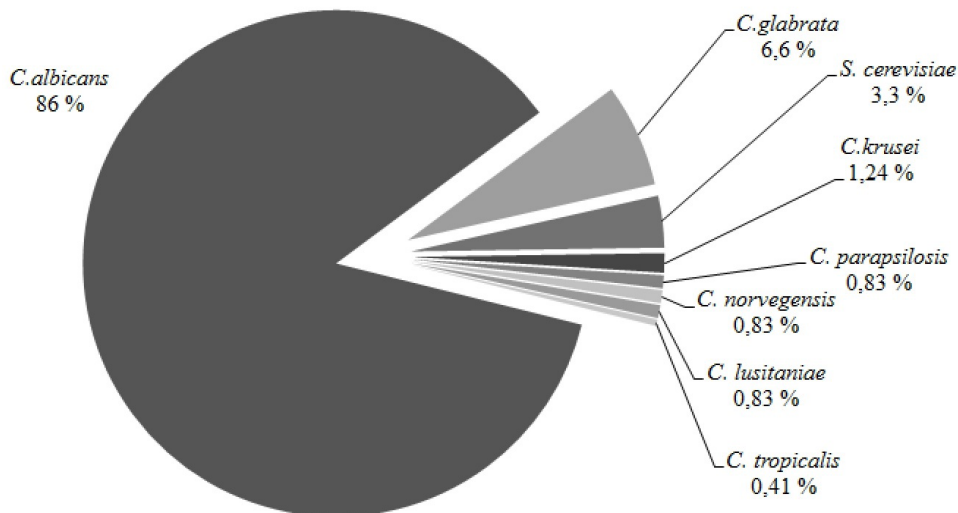


Ryc. 1. Schemat diagnostyczny materiałów z dróg rodnych w kierunku grzybów drożdżopodobnych

W badaniach własnych u 98% badanych pacjentek (n=404) stwierdzono obecność pojedynczego czynnika etiologicznego. Gatunkiem najczęściej izolowanym w przypadku grzybiczego zakażenia pochwy była *Candida albicans*. Drugim co do częstości izolowanym gatunkiem była *C. glabrata*, kolejno *C. krusei*. Pozostałe gatunki drożdżaków izolowane były znacznie rzadziej – poniżej 7%. Łącznie gatunki należące do grupy *Candida non-albicans* były przyczyną infekcji grzybiczej pochwy u 68 kobiet, co stanowi 13,9% rozpoznanych grzybic. Ponadto u 2% kobiet zidentyfikowano po dwa szczepy grzybów drożdżopodobnych. (*Candida albicans* i *C. glabrata*, *C. albicans* i *C. lusitaniae*, *C. albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*). Odsetek izolacji poszczególnych gatunków grzybów drożdżopodobnych przedstawiono na rycinie 2.

Czynności manualne związane z przygotowywaniem szczepu *Candida sp.* do identyfikacji w spektrometrze MALDI Biotyper (ekstrakcja białek rybosomalnych z użyciem etanolu i kwasu mrówkowego) oraz analiza szczepu wraz z otrzymaniem wyniku identyfikacji, nie przekraczały 15 minut. Natomiast identyfikacja grzybów drożdżopodobnych metodą biochemiczną trwa od 18 godzin w systemie automatycznym VITEK 2 (bioMerieux), do 48 godzin w systemie półautomatycznym API ID 32 C (bioMerieux) (Tab.I). Czas identyfikacji drobnoustroju z zastosowaniem spektrometrii

mas jest najkrótszy spośród wszystkich dostępnych obecnie technik diagnostycznych (19). Kluczowym etapem analizy jest przygotowanie próbki, które wymaga od mikrobiologa biegłości w wykonywaniu ekstrakcji i dokładnym nakładaniu analizowanego materiału na płytkę.



Ryc. 2. Gatunki grzybów izolowane z pochwy pacjentek w wieku rozrodczym (n=412), z użyciem techniki spektru mas typu MALDI-TOF

Uzyskane w badaniach własnych wyniki są zgodne z pracą zespołu *Stefaniuk* i wsp. (20), który potwierdził użyteczność metody MALDI-TOF w różnicowaniu szczepów grzybów drożdżopodobnych, uzyskując prawidłową identyfikację szczepów na poziomie 71,8%, 26,6%, 1,6% dla zakresów  $\geq 2,300$ ,  $\geq 2,000$ ,  $\geq 1,800$ .

Dane literaturowe potwierdzają, że najczęstszym gatunkiem drożdżaków izolowanym z pochwy (80,2% wszystkich przypadków zakażeń grzybiczych) jest niezmiennie *Candida albicans* (1,11, 14, 21). W ostatnich latach obserwuje się wzrost izolacji gatunków *Candida non-albicans*, wykazujących obniżoną wrażliwość na leki przeciwgrzybicze (10). Wśród gatunków *Candida non-albicans* najczęściej izolowane są: *Candida glabrata* (7,9%), *Candida parapsilosis* (1,7%) i *Candida tropicalis* (1,4%) (13). Obserwowany jest wzrost odsetka izolatów szczepów *Candida non-albicans*, ta tendencja wzrostowa wynika prawdopodobnie z rozwoju technik analizy grzybów, które umożliwiają identyfikację coraz większej liczby gatunków drożdżaków w obrębie tej grupy. Dla porównania tabela identyfikacyjna systemu ID 32 C (bioMerieux) zawiera 32 szczepy *Candida sp.*, karta YST wykorzystywana w aparacie Vitek 2 (bioMerieux) pozwala na analizę 27 drożdżaków *Candida sp.*, natomiast biblioteka spektrometru masowego MALDI-TOF umożliwia identyfikację 81 gatunków *Candida sp.*

Tabela I. Zestawienie czasu identyfikacji grzybów drożdżopodobnych z wykorzystaniem systemu półautomatycznego, automatycznego i spektrometrii mas typu MALDI-TOF.

Czas wykonania:	API ID 32 C (bioMérieux)	VITEK 2 (bioMérieux)	MALDI-TOF (Bruker)
czynności manualnych	8 minut	5 minut	14 min
identyfikacji	24-48 godzin	18 godzin	1 min
łącznie czas analizy	48 godzin i 8 minut	18 godzin i 5 min	15 min

Wykazano, że spektrometria mas typu MALDI-TOF, silnie różnicuje poszczególne gatunki drobnoustrojów, ponieważ główny profil masowy uzyskany przez system, jest profilem białek rybosomalnych, na podstawie, których oparta jest współczesna klasyfikacja taksonomiczna (7). Jest to szczególnie ważne w prawidłowej identyfikacji szczepów znanych z obniżonej lekowrażliwości takich jak np. *Candida krusei* i *C. glabrata* (wysoka odporność na flukonazol). Kolejny przykład to możliwość precyzyjnego rozróżnienia na *Candida norvegensis* i *Candida inconspicua* w przypadku spektrometrii mas, technika ta nie pozostawia wątpliwości co do gatunku, natomiast system ID 32 C, jako wynik identyfikacji wskazuje *Candida inconspicua/Candida norvegensis*, a aparat Vitek 2 oznacza wynik *Candida inconspicua/Candida lambica*. Ponadto ze względu na fakt, iż technika MALDI-TOF oparta jest na analizie unikatowego profilu białkowego, cechuje ją wysoka odtwarzalność identyfikacji drobnoustrojów. Szereg publikacji wskazuje, że metoda spektrometrii masowej będzie miała coraz większe zastosowanie w identyfikacji grzybów drożdżopodobnych (9, 12, 17).

Podsumowując wyniki własne oraz dane literaturowe metoda spektrometrii mas typu MALDI-TOF charakteryzuje się wysokim stopniem wiarygodności i szybkością uzyskania wyniku. Czas od rozpoczęcia procedury do uzyskania wyniku identyfikacji nie przekracza 15 minut, co skraca proces diagnostyczny o co najmniej 48 godzin w porównaniu do identyfikacji w systemach półautomatycznych, i o co najmniej 18 godzin w przypadku systemów automatycznych. Metoda ta może być z powodzeniem stosowana do rutynowej identyfikacji grzybów drożdżopodobnych, a w szczególności pożądana jest w przypadku identyfikacji szczepów z grupy *Candida non-albicans*, charakteryzujących się niższą wrażliwością na leki przeciwgrzybicze. Umożliwia to szybsze wdrożenie racjonalnej terapii przeciwgrzybiczej, dzięki znajomości przynależności gatunkowej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Boon ME, van Ravenswaay HH, Kok LP. Urbanization and baseline prevalence of genital infections including *Candida*, *Trichomonas*, and human papillomavirus and of a disturbed vaginal ecology as established in the Dutch Cervical Screening Program. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 365-9.
2. Donders GGG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 355-73.
3. Eckert LO. Acute vulvovaginitis. *N Engl J Med* 200; 355:1244-52.

4. Ferrer J. Vaginal candidiasis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 71, 21-7.
5. Fidel PL. Immune regulation and its role in the pathogenesis of *candida vaginitis*. *Curr Infect Dis Rep* 2003; 5: 488-93.
6. Grzybnice błon śluzowych. W: Mikologia - co nowego. Red. Baran E. Cornetis, Wrocław 2008, 175-180.
7. Intelicato-Young J, Fox A. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 2013; 92(3):381-6.
8. IVD MALDI Biotyper 2.3. Podręcznik użytkownika. Bruker Daltonik 2013.
9. Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO, Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *International Journal of Infection Diseases* 2014; 26: 167-70.
10. Kennedy M, Sobel J, Vulvovaginal candidiasis caused by non-albicans *Candida* species: new insights. *Curr Infect Dis Rep* 2010; 12: 465-70.
11. Macura A, Skóra M, Fungi isolated from the vagina and their susceptibility to antifungals. *Ginekol Pol* 2012; 83: 433-8.
12. Marklein G, Josten M, Klanke U i inni. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2912-7.
13. Richter SS, Galask RP, Messer SA, i inni. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Clin Microbiology* 2005; 43: 2155-62.
14. Singh S, Sobel J, Bhargava P i inni. Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1066-70.
15. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B. Vulvo-vaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic consideration. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 203-11.
16. Sobel JD, Vulvovaginal candidosis, *Lancet* 2007; 369: 1961-71.
17. Sow D, Bicepsy F, Ndiaye M i inni. Usefulness of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Routine Identification of *Candida* species in a Resource-Poor Setting. *Mycopathologia* 2015; 180: 173-9.
18. Stanowisko zespołu ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące etiopatogenezy i leczenia nawrotowej postaci drożdżakowego zapalenia pochwy i sromu. *Ginekol Pol* 2011; 82: 869-73.
19. Spektrometria mas. W: Medyczne laboratorium diagnostyczne. Metodyka i aparatura. Red. Solnica B, Sztęfko K. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2015, 315-6.
20. Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W. Usefulness of CHROMagar Candida Medium, Biochemical Methods – API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. identification. *Polish Journal of Microbiology* 2015; 65, 1: 111-4.
21. Stock I. Fungal diseases of vulva and vagina caused by candida species. *Med Monatsschr Pharm* 2010; 33: 324-33.
22. Zakażenia grzybicze. W: Atlas stopni czystości pochwy. MedPharm Polska. Wrocław 2012, 16-18.
23. Zabicka D, Kuch A, Nowa Klinika 2008; 15 5-6: 4-11.

Otrzymano: 16 V 2016 r.

Adres Autora: 31-120 Kraków, al. Mickiewicza 21, Katedra Mikrobiologii,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
e-mail: hania.kawalec@gmail.com

## Grzyby pleśniowe w środowisku człowieka – zagrożenie i skutki zdrowotne

Health risks associated with the environmental presence of toxigenic moulds

*Anna Chróst*

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

---

**Grzyby pleśniowe wywołują zarówno ciężkie infekcje płuc jak również mogą mieć kancerogeny, cytotoksyczny i neurotoksyczny wpływ na organizm człowieka. Kontakt z zarodnikami pleśni skutkuje pojawieniem się u narażonych osób reakcji alergicznych, obniżeniem odporności organizmu i występowaniem toksycznego zespołu określanego mianem „zespołu chorego budynku”. Omówiono występowanie grzybów pleśniowych w zamkniętych pomieszczeniach mieszkalnych oraz zagrożenia zdrowotne związane z ich obecnością w środowisku człowieka. Podano krótką charakterystykę wybranych pleśni toksynotwórczych oraz wytwarzane przez nie mykotoksyny.**

**Słowa kluczowe:** *pleśnie, Aspergillus, mykotoksyny, alergia, astma*

---

### ABSTRACT

**Introduction:** This study reviews the occurrence and most common health effect of exposure to moulds in different environment. The short characteristic of chosen toxigenic fungi and the major mycotoxin classes was also presented. Exposure to allergens may cause human disease, including allergic rhinitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, hypersensitivity pneumonitis asthma and sick building syndrome. Moulds also reveal carcinogenic, cytotoxic, and neurotoxic properties.

**Key words:** mold, *Aspergillus*, mycotoxins, allergy, asthma

## WPROWADZENIE

Termin „pleśnie” to potoczna nazwa grzybów strzępkowych występujących powszechnie w środowisku. Najczęściej spotykanymi w otoczeniu człowieka są grzyby z grupy *Zygomycota* (sprzężniaki), *Ascomycota* (workowce) oraz *Deuteromycota* (tzw. *Fungi imperfecti* - grzyby niedoskonałe). Pleśnie są heterotrofami odżywiającymi się żywą lub martwą materią organiczną. Dzięki niewielkim wymaganiom pokarmowym opanowały niemal każdą niszę ekologiczną, zasiedlając również mieszkalne środowisko człowieka i budynki użyteczności publicznej. Wpływ na zagrzybienie pomieszczeń ma przede wszystkim zła izolacja przeciwwilgociowa ścian i fundamentów, nieszczelne pokrycia dachowe, wadliwe ocieplenie, niedogrzanie mieszkań czy też zła instalacja wentylacyjna (27). Oddychanie zanieczyszczonym powietrzem zwiększa ryzyko alergii, skutkując nieżytem błony śluzowej nosa, astmą oskrzelową bądź zapaleniem pęcherzyków płucnych (AZPP). U osób z obniżoną odpornością ekspozycja na pleśnie może prowadzić do rozwoju aspergilozy płuc, a także zmian nowotworowych i neurotoksycznych.

## CHARAKTERYSTYKA I WYSTĘPOWANIE GRZYBÓW PLEŚNIOWYCH

Najpowszechniej w zamkniętych pomieszczeniach występują grzyby z rodzaju *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Aspergillus*. W dalszej kolejności izolowane są gatunki z rodzaju *Fusarium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Mucor*, *Scopulariopsis* i *Trichotecium* (24, 37, 39, 63). W zawilgoconych pomieszczeniach dominują pleśnie z gatunku *Stachybotrys chartarum* o czarnym zabarwieniu grzybni (34, 41, 58). Lekarze alergolodzy wyróżniają grzyby zewnątrz i wewnątrz domowe. Należy jednak pamiętać, że poszczególne gatunki mogą występować w obu środowiskach, a na liczebność zarodników w powietrzu domowym wpływ ma liczebność zarodników w powietrzu atmosferycznym. Intensywność uwalniania zarodników jest zależna od gatunku grzyba oraz warunków pogodowych. Przeważnie, wyższe stężenie zarodników notuje się przy wietrznej, suchej i słonecznej pogodzie. Z reguły, wzrost stężenia zarodników w powietrzu obserwuje się wraz ze wzrostem temperatury otoczenia. Z tego powodu, najwięcej przypadków zachorowań występuje w okresie letnim (24, 38). Istnieją gatunki wilgociolubne (higrofilne) z klasy *Ascomycetes*, wytwarzające zarodniki w czasie wilgotnej pogody, często w nocy podczas opadów deszczu.

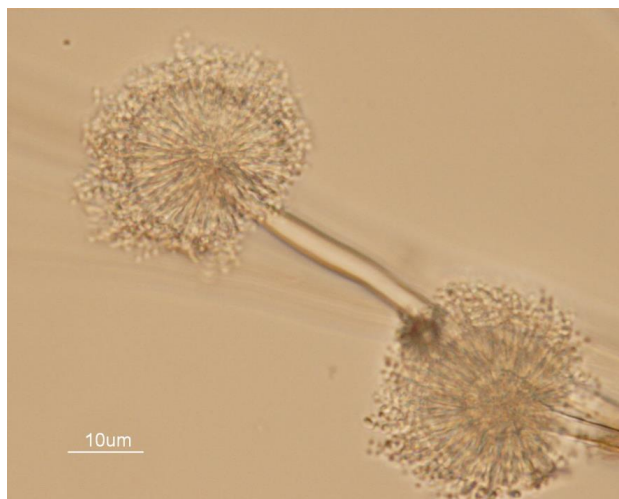
Wyniki badań naukowych wskazują, że zanieczyszczenie powietrza zarodnikami często przekracza dopuszczalne normy (8, 26, 27). Szacuje się, że skażenie alergenami i mykotoksynami grzybów dotyczy około 25% domów mieszkalnych w Polsce i to niezależnie od stanu technicznego i wieku budynków. Najczęściej zagrzybienie obejmuje pomieszczenia sanitarne – łazienki, toalety, ale także kuchnie, piwnice, werandy i balkony (54). Rezerwuarem pleśni w środowisku domowym są często rośliny i zwierzęta domowe. Doskonałą pożywką dla grzybów są tapety, płyty pilśniowe, gipsowe, papier, płótno, drewno i kurz (3, 41, 48). W pomieszczeniach, w których podłogi wyłożone są dywanami stwierdza się w powietrzu nawet trzykrotnie większe stężenia grzybów z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* niż w pomieszczeniach bez dywanów (22).

Zanieczyszczenie pleśniami stanowi problem nie tylko w środowisku mieszkalnym. Niektóre grupy zawodowe są szczególnie narażone na wysokie stężenia zarodników

i mykotoksyn w miejscu pracy. Dotyczy to głównie osób pracujących w sektorze rolno-spożywczym, a także w innych sektorach gospodarki, w których jakość powietrza zdecydowanie odbiega od jakości powietrza w pomieszczeniach mieszkalnych. Rolnicy mają kontakt zarówno z grzybami „polowymi” rozwijającymi się na uprawach, jak i grzybami „przechowywanymi” zanieczyszczającymi składowane ziarno i pasze. Narażeni są na wysokie stężenia zarodników zarówno podczas uprawy, zbioru jak i magazynowania zbóż i pasz. Liczne badania potwierdzają obecność mykotoksyn nie tylko w ziarnach, ale także i w unoszącym się pyłe (36). W jednym gramie wilgotnego siana może być nawet do 250 milionów zarodników potencjalnie toksynotwórczych grzybów (14). Do miejsc o zwiększonym ryzyku występowania wysokiego stężenia zarodników zaliczyć można elewatory, magazyny i młyny zbożowe, wytwórnie kasz i pasz, przetwórnice surowców roślinnych, wytwórnie kwasu cytrynowego, serów pleśniowych, przetwórnice drewna – tartaki, kompostownie odpadów, a także miejsca związane z konserwacją obrazów i zabytków (19, 28, 35, 56, 59). Panujący w tych miejscach mikroklimat zapewniający dostępność składników odżywczych sprzyja rozwojowi grzybów i produkcji mykotoksyn, zaś powstający bioaerozol grzybowy stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia pracowników.

#### CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH PLEŚNI

Przynależność poszczególnych gatunków grzybów do danego rodzaju określa się na podstawie budowy zarodników i konidioforów tj. szczytowych zakończeń strzępek na których powstają zarodniki konidialne.



Fot 1. Zakończenie konidioforu *Aspergillus ochraceus*

**Rodzaj *Aspergillus*** – konidiofor u grzybów należących do tego rodzaju przybiera kształt pęczeryka, który w zależności od gatunku może być okrągły, elipsoidalny bądź maczugowaty. Pęczeryk pokrywają fialidy (tzw. komórki konidiotwórcze) bądź metule z fialidami, na szczycie których tworzą się łańcuszki zarodników. Tak zbudowany

konidiofor – pęcherzyk wraz z metulami, fialidami i łańcuszkami zarodników tworzy tzw. „główkę konidialną” (20, 49, 53, 62). Do rodzaju *Aspergillus* zalicza się około 350 gatunków grzybów, spośród których tylko siedem jest patogennych dla człowieka, zaś do najczęściej występujących w środowisku i zarazem najniebezpieczniejszych należą m. in.: *A. fumigatus*, *A. flavus* i *A. ochraceus* (67).

*Aspergillus fumigatus* - gatunek termofilny o optymalnej temperaturze wzrostu od 55°C do nawet 70°C (28, 53). Na stałym podłożu w laboratorium obserwowany jest wzrost również w niższych temperaturach, rzędu 25°C (53). Pleśń ta tworzy kolonie barwy ciemno-zielonej, o puszystej strukturze i jasnym spodzie. Pod mikroskopem widoczne są wydłużone, zielonkawe konidiofory długości od 20-30 µm, z jednym rzędem fialid (6-8 µm) i zielone, chropowate konidia (2,5-3 µm) uformowane w łańcuszki (Fot. 2) (20, 53).



Fot 2. Zakończenie konidioforu *Aspergillus fumigatus*

Do czasu gdy zaobserwowano rozwój grzybni w płucach u osób narażonych na ciągłą obecność zarodników *A. fumigatus* gatunek ten postrzegany był jako słaby patogen, któremu przypisywano głównie odpowiedzialność za wywoływanie chorób alergicznych (17). Dziś już wiadomo, że gatunek ten jest odpowiedzialny za około 90% zakażeń wywoływanych przez grzyby pleśniowe, przebiegających często jako zakażenia inwazyjne (16, 17). Do grup ryzyka zalicza się przede wszystkim osoby o obniżonej odporności tj. pacjentów po przeszczepach, chemioterapii, z chorobą autoimmunologiczną i AIDS (15). *A. fumigatus* odpowiada za około 30% zakażeń grzybiczych u pacjentów z nowotworami i u około 10-25% chorych na białaczkę (67).

*Aspergillus flavus* - grzyb ten rośnie w przedziale temperatur 12°C - 48°C, przy czym optymalna temperatura wzrostu wynosi 37°C, a optymalna aktywność wodna ( $a_w$ ) waha się pomiędzy 0,86 a 0,96 (69). Na podłożu stałym w warunkach laboratoryjnych kolonie *A. flavus* są początkowo białe, później jasnożółte, z czasem przybierają kolor żółtozielony lub brązowy, o czerwono-brązowym spodzie (20). Konidiofory są bezbarwne, o chropowatych ściankach i długości ok. 1 mm. Na ich końcu tworzy się smukły pęcherzyk o średnicy 10-65



$\mu\text{m}$ , który z czasem przybiera kształt kulisty. Na szczycie fialid, usytuowanych w jednym bądź w dwóch rzędach, formują się chropowate, kuliste lub owalne konidia, o średnicy 3,5 - 4,5  $\mu\text{m}$  (49, 53). Gatunek ten jest najliczniejszy spośród wszystkich grzybów z rodzaju *Aspergillus* występujących w środowisku, powodując często ze względu na swoją wysoką patogenność, ciężko przebiegające zakażenia u hospitalizowanych pacjentów. *A. flavus* jest również potencjalnym producentem aflatoksyn, uznanych za jedne z najbardziej toksycznych i kancerogennych związków występujących naturalnie w przyrodzie. Jest sprawcą ostrego, przewlekłego zapalenia zatok, zapalenia rogówki, ucha, płuc i ogólnoustrojowych zakażeń pacjentów z obniżoną odpornością w tym skórnych zakażeń ran, zapaleń szpiku kości po wszczepieniu i urazach (29, 64).

***Aspergillus ochraceus*** - na podłożu stałym w warunkach laboratoryjnych rośnie w postaci niskich, początkowo kremowo-żółtych kolonii, z czasem przybierając kolor żółto-pomarańczowy ze spodem kolonii w kolorach od pomarańczowego do brązowego (6, 43). Pod mikroskopem widoczne są żółte bądź jasnobrązowe konidiofory, długości 25-55  $\mu\text{m}$ , zakończone okrągłymi pęcherzykami (6-30  $\mu\text{m}$  średnicy) pokryte dwoma rzędami fialid (7-12  $\mu\text{m}$ ), na których zebrane są kuliste, chropowate konidia o średnicy 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  (Fot. 1). Wytwarza toksyczne ochratoksyny, aflatoksyny oraz kwas penicylinowy (23). Występuje powszechnie w glebie, na szczątkach roślin, a także na przechowywanym zbożu, orzeszkach ziemnych i ziarnach kawy.

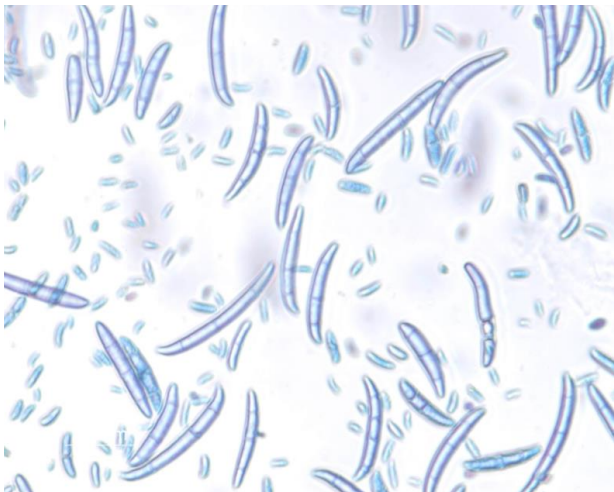
**Rodzaj *Penicillium*** - w klimacie umiarkowanym stanowi zróżnicowaną, szeroko rozproszoną grupę mikroorganizmów. Pleśnie te charakteryzują się szybkim wzrostem, tworząc niską, początkowo białą, a później zielono-niebieską grzybnię, często z białą obwódką na brzegach. Niekiedy na powierzchni kolonii pojawia się żółta lub bezbarwna wydzielina w postaci kropelek (20, 49). Dokładne oznaczenie gatunku stwarza często problem, ponieważ morfologia konidioforów i charakter grzybni są uzależnione od warunków środowiskowych i warunków laboratoryjnych, takich jak składniki odżywcze, temperatura, oświetlenie i wilgotność (68). W obrazie mikroskopowym widoczne są konidiofory uformowane w charakterystyczny, rozgałęziony bądź nierozgałęziony pędzelek, mający uporządkowaną, piętrową strukturę. Kolejne poziomy stanowią rozmieszczone w pęczkach metule, a na nich fialidy wytwarzające na szczycie sznury zarodników (Fot. 6). W zależności od gatunku konidia przybierają kształt okrągły, owalny bądź elipsoidalny, o gładkiej lub szorstkiej powierzchni (53). Rodzaj *Penicillium* liczy ponad 200 gatunków grzybów. Do najczęściej spotykanych w środowisku zamkniętych pomieszczeń należą: *Penicillium expansum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium cyclopium*. Gatunki te często występują na produktach żywnościowych – czerstwym chlebie, serach, owocach takich jak jabłka i cytrusy, przyczyniając się nie tylko do psucia żywności ale i skażając ją poprzez wytwarzane mykotoksyny (21). Grzyby z rodzaju *Penicillium* zaliczane są do powszechnie występujących w powietrzu alergenów. Grzyby te potrzebują do wzrostu znacznej wilgotności środowiska, dlatego często izolowane są z zawilgoconych pomieszczeń mieszkalnych, bibliotek a także piekarni. *P. notatum* i *P. chrysogenum* wykorzystywane są także do produkcji antybiotyków m. in. cyklopeniny, kwasu cyklopiazonikowego i penicylinowego. Inne gatunki jak *P. camemberti* i *P. roqueforti* wykorzystywane są w przemyśle spożywczym do produkcji serów.

**Rodzaj *Stachybotrys*** – najczęściej izolowaną pleśnią należącą do tego rodzaju jest *Stachybotrys chartarum*, który w warunkach laboratoryjnych początkowo charakteryzuje się szarobiałym, następnie szaroczarnym zabarwieniem grzybni. Jest to wolno rosnąca pleśń,

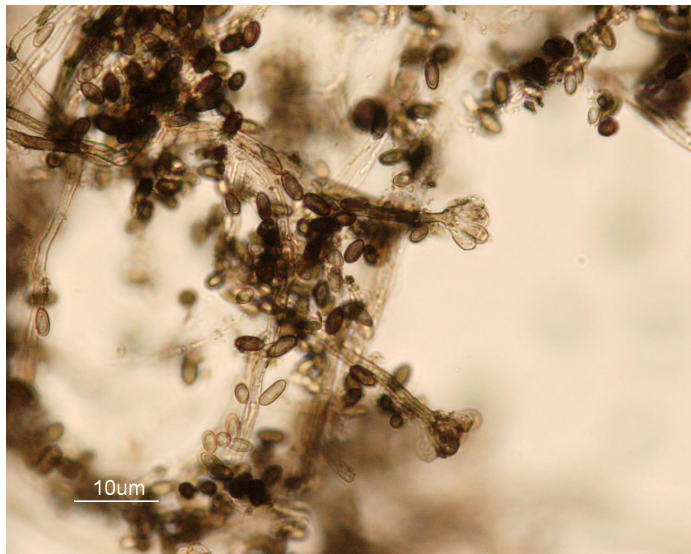
wymagająca wilgoci, dlatego jej zarodniki giną w powietrzu atmosferycznym. Do wzrostu wymaga wysokiej aktywności wodnej rzędu 0,94-0,98. Najczęściej występuje więc na zawilgoconych materiałach budowlanych o wysokiej zawartości celulozy, takich jak płyty pilśniowe, gipsowe, tapety, papier, płótno, materiały tekstylne i drewno (27, 40, 42, 63). Grzyb ten występuje również w glebie, na ziarnach, martwych szczątkach roślinnych, w szczególności spotykany jest w sianie i słomie (2). Strzępki tworzą proste bądź rozgałęzione konidiofory na których w pęczkach zebrane są maczugowate, wydłużone fialidy, tworzące szaroczarne, elipsoidalne bądź kuliste konidia (Fot. 5). Może wytwarzać satratoksyny G i H oraz rorydyny (12, 25, 31, 42). U osób narażonych na wdychanie zarodników tej pleśni mogą wystąpić objawy alergiczne oraz przewlekłe zmęczenie (31).



Fot 3. Zarodniki *Alternaria* sp.



Fot. 4. Mikro i makrokonidia *Fusarium* sp.



Fot. 5. Zakończenie konidioforu i zarodniki *Stachybotrys chartarum*



Fot. 6. Zakończenie konidioforu *Penicillium* sp.

**Rodzaj *Alternaria*** - grzyby należące do tego rodzaju wytwarzają niskie, aksamitne czarno-szare bądź oliwkowo-brązowe kolonie, od spodu brązowo-czarne lub szaro-czarne. Do wzrostu potrzebują aktywności wodnej w zakresie 0,8-0,9 (41). Pod mikroskopem widoczne są brązowe strzępki i wielokomórkowe, charakterystyczne, maczugowate konidia, powstające po bokach lub na szczycie słabo rozgałęzionych, septowanych konidioforów. Konidia tworzą łańcuszki, są jasno lub ciemnobrązowe, o powierzchni

gładkiej lub chropowatej, niektóre w zależności od gatunku mogą być zakończone długim, nitkowatym wyrostkiem (Fot. 3; 20). Najczęstszym przedstawicielem tego rodzaju jest gatunek *Alternaria alternata*, będący alergenem górnych dróg oddechowych, izolowany także z ran u zwierząt, pospolity sporofit i pasożyt liści, pędów i owoców, powodujący powstawanie ciemnych plam nekrotycznych na ich powierzchni (4).

**Rodzaj *Cladosporium*** - charakterystyczna dla tego rodzaju jest zwarta, gęsta, aksamitna struktura grzybni, zielonoszare zabarwienie i powolne tempo wzrostu. Dolna strona kolonii przybiera barwę od ciemno-zielonej do czarnej (49). Mikroskopowa struktura jest bardzo krucha, o drzewkowatym charakterze, prostych oliwkowych bądź ciemnobrunatnych konidioforach, wygiętych na szczycie. Typowe zarodniki tworzą łańcuszki, mogą być kuliste, owalne lub walcowate, tępo lub ostro zakończone, jedno, dwu lub trzykomórkowe, o powierzchni gładkiej lub chropowatej, barwy jasnoszarej lub szarobrazowej. Optymalne warunki do rozwoju grzybni mieszczą się w przedziale temperatur od 18°C do 28°C, chociaż gatunek ten może przetrwać w bardziej skrajnych warunkach. Rodzaj *Cladosporium* dominuje w grzybiczej mikroflorze powietrza w pomieszczeniach i choć jest mniej patogenny od grzybów z rodzaju *Alternaria* może być przyczyną licznych alergii, zapalenia rogówki i zapalen skóry. Izolowany jest również z gnijących szczątków roślinnych, siana, produktów żywnościowych, takich jak mięso, sery, warzywa i zboże. Do gatunków najczęściej występujących w powietrzu należą *Cladosporium cladosporioides* i *Cladosporium herbarum* - potencjalny producent ochratoksyny.

**Rodzaj *Fusarium*** - gatunki należące do tego rodzaju tworzą jasną, obfitą, kłaczkowatą grzybnię, koloru od białego poprzez kremowy, szarobiały, do szaro-różowego bądź fioletowo-różowego. Rosną w temperaturach od 25°C do 30°C, choć odporne są zarówno na niższe jak i wyższe temperatury w zakresie 5°C - 37°C. W naturalnym środowisku pleśnie te tworzą skupiska drobnych, poduszkowatych konidioforów zwanych sporodochiami lub skupienia trzonek konidialnych tzw. pionnot. W warunkach laboratoryjnych konidiofory powstają stopniowo na strzępkach powietrznych i nie tworzą skupisk. Przynależność do danego gatunku określa się na podstawie charakterystycznych zarodników mikro- i makrokonidiów (Fot. 4). Pierwsze są owalne i jednokomórkowe, drugie od dwu- do wielokomórkowych, w kształcie rogalika (20, 49). Do najczęściej spotykanych w środowisku należą takie gatunki jak: *F. poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. oxysporum*, *F. solani*. Grzyby te przede wszystkim skażają zboża i inne rośliny uprawne, wytwarzają mykotoksyny szkodliwe dla ludzi i zwierząt oraz powodują grzybicę paznokci, zapalenie rogówki, oka i infekcje skóry (50).

## PRZEGLĄD WYBRANYCH MYKOTOKSYN

Mykotoksynami określa się niskocząsteczkowe ( $M < 1,5$  kDa), wtórne metabolity grzybów pleśniowych, które wprowadzone do organizmu nawet w niewielkich dawkach drogą pokarmową, oddechową, bądź przez skórę i błony śluzowe, wywołują reakcje toksyczne. Definicja ta odnosi się do substancji toksycznych wytwarzanych przez grzyby wyższe i drożdże, ponieważ do wywołania objawów chorobowych potrzebna jest znacznie większa dawka i określa się je jako trucizny (14).

W latach 60-tych ubiegłego wieku metabolity pleśni cieszyły się dużym zainteresowaniem ze względu na antybiotyczne właściwości. Przykładem może być kwas

penicylinowy wytwarzany przez *Penicillium puberulum* czy też werukaryny wytwarzane przez *Myrothecium verrucaria*. Późniejsze badania wykazały, że toksyczność tych związków znacznie przewyższa ich właściwości lecznicze (11). Zatrucia ludzi i zwierząt po spożyciu zapleśniałej żywności obserwowane były od bardzo dawna. W starym testamencie opisywane są przypadki „rojnicy”, czyli zatrucia sporyszem. Historyczne źródła donoszą też, że toksyny *Fusarium* mogły być przyczyną wyginięcia Etrusków, a „klątwa Tutenchamona”, która zaatakowała archeologów podczas prac wykopaliskowych w piramidach to nic innego jak zakażenia wywołane inhalacją spor grzybów i zawartych w nich mykotoksyn, zwłaszcza ochratoksyny A (63). Trzeba mieć na uwadze, że grzyby wytwarzają toksyny w obronie przed innymi mikroorganizmami, głównie przed bakteriami, jednakże związki te stanowią zagrożenie także i dla człowieka. Stopień ich toksyczności zależy zarówno od składu chemicznego jak i stężenia w organizmie. W grupie tej znajduje się około 400 związków, które ze względu na swoje właściwości i budowę chemiczną można podzielić na kilka podgrup, spośród których 6 posiada ocenę toksykologiczną (55). Do najważniejszych pod względem klinicznym zaliczyć można aflatoksyny, ochratoksynę A, trichoteceny, satratoksynę produkowaną przez *Stachybotrys chartarum* oraz zearalenon wytwarzany przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

**Aflatoksyny** reprezentowane są przez grupę około 20 heterocyklicznych pochodnych difokumaryny produkowanych głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* m. in. *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus* (55). W grupie aflatoksyn wyróżnia się aflatoksynę B1, B2, G1 i G2, oznaczone w ten sposób ze względu na przyjmowaną barwę w świetle UV (B od ang. Blue, G od ang. Green). Tylko *A. parasiticus* może wytwarzać wszystkie cztery typy toksyn, gdyż jako jedyny wytwarza aflatoksynę G (14). Wytwarzanie aflatoksyn zależne jest od rodzaju podłoża jak i od warunków mikroklimatycznych. Sprzyjająca jest wysoka temperatura rzędu 25°C - 30°C i wilgotność powyżej 90%. Spośród wszystkich toksyn najbardziej kancerogenna jest aflatoksyna B1. Toksyna ta metabolizowana jest w organizmie do równie toksycznej, choć mniej kancerogennej, aflatoksyny M1 (60), która może przechodzić do mleka i stanowić zagrożenie dla ludzi („M” od ang. Milk). O reaktywności aflatoksyny B1 decyduje podatny na hydrolizę pierścień laktozowy w reszcie kumarynowej oraz podwójne wiązanie w pozycji 8 i 9 pierścienia furanowego. Dzięki takiej budowie cząsteczka aflatoksyny może ściślej łączyć się z cząsteczką DNA lub białka zmieniając jego strukturę i prowadząc do zaburzeń replikacji i transkrypcji w prawidłowym funkcjonowaniu komórki (14). Badania wykazały również, że aflatoksyna B1 może ulegać przekształceniom do związków łatwiej wydalanych z organizmu. Podczas takich przekształceń, w wyniku epoksydacji mogą powstawać inne toksyczne metabolity m. in. tlenek aflatoksyny, który łącząc się z guaniną w pozycji N7 w łańcuchu DNA może prowadzić do mutacji w łańcuchu DNA (14, 60). Mutacje w genie supresorowym p53 wykorzystywane są w badaniach nad molekularnym podłożem powstawania raka wątrobowo-komórkowego (hepato cellular carcinoma, HCC). Mutacje te zachodzą w 249 kodonie genu p53 i dotyczą zamiany guanozyny na tyminę. Aflatoksyna B1 może również hamować syntezę RNA (jądrowego, informacyjnego i rybosomalnego) co wpływa na zahamowanie syntezy białek (14). Na skutek działania aflatoksyn najczęściej dochodzi do uszkodzenia wątroby, nerek, śledziony i płuc. Inne działania niepożądane to spadek apetytu, działanie immunotoksyczne i alergenne. Związki te są odporne na działanie wysokiej temperatury, ulegają natomiast rozkładowi pod wpływem promieniowania UV

i promieniowania widzialnego. Aflatoksyny wytwarzają się najczęściej na orzeszkach ziemnych, nasionach bawełny, orzeszkach laskowych, ziarnach zbóż (zwłaszcza kukurydzy) (14, 55). Uznano je za najbardziej kancerogenne związki wytwarzane przez drobnoustroje. Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem (IARC) w 1987 roku zakwalifikowała te związki do pierwszej grupy związków rakotwórczych dla człowieka (55, 60) a ich pochodne, aflatoksyny M do grupy 2B (51).

**Ochratoksyny** - w skład ochratoksyn wchodzi 3 związki oznaczone literami A, B i C. Najsilniejszy efekt toksyczny wywiera ochratoksyna A (chlorodeuhydroizokumaryna, OTA). Wyizolowana po raz pierwszy w 1965 roku jako wtórny metabolit *Aspergillus ochraceus*. Późniejsze badania wykazały, że wytwarzać ją mogą także inne gatunki z rodzaju *Aspergillus* (w klimacie gorącym w zakresie temperatur 25°C - 28°C) i grzyby z rodzaju *Penicillium* (w klimacie umiarkowanym w temperaturze 21-25°C) przy aktywności wodnej powyżej 0,7 (52). Związek ten jest peptydem aminokwasu L-fenylalaniny, połączony z pochodną kumaryny – kwasem izokumarynowym. O reaktywności związku decyduje atom chloru podstawiony w pierścieniu benzenowym i grupa fenolowa. Usunięcie z cząsteczki fenylalaniny lub zastąpienie jej innym aminokwasem znacznie obniża toksyczność tego związku. Przykładem jest pozbawiona chloru ochratoksyna B, która w porównaniu z ochratoksyną A jest niemal nieszkodliwa. Ochratoksyny są wysoce termostabilne (57). Związki te wykazują silną toksyczność, wywierają efekt neurotoksyczny, teratogeny, upośledzają odporność, przede wszystkim uszkadzają nerki. Ochratoksyna A może kumulować się w mięśniach, wątrobie i innych tkankach zwierząt karmionych skażoną paszą, dlatego jej obecność stwierdza się w mięsie wieprzowym, którego spożywanie może stanowić ryzyko pojawienia się nefropatii ochratoksynowej u ludzi (33) i występowania nowotworów układu moczowego (60). Mięso przeżuwaczy jest wolne od ochratoksyn w związku z tym, iż związki te są metabolizowane przez florę bakteryjną żwacza. IARC zaliczył ochratoksynę A do grupy 2B związków rakotwórczych dla człowieka.

**Trichoteceny** stanowią szeroką grupę związków wytwarzanych przez gatunki z rodzaju *Trichotecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Fusarium* i *Stachybotrys* (11). Wszystkie zawierają w swej budowie seskwiterpenoidowy pierścień i ugrupowanie epoksydowe w pozycji C<sub>12,13</sub> (61). W zależności od różnic w budowie chemicznej związku podzielono na 4 grupy: grupa A (Toksyna T-2, HT-2, diacetoksyscirpenol); grupa B (deoksyniwalenol, niwalenol); grupa C (krotocyna); grupa D (saratoksyna, roridyna) (32). Związki te są wysoce stabilne i odporne na przekształcenia. Mogą też kumulować się w tkankach zwierząt skarmianych skażoną paszą i w konsekwencji przedostawać się do organizmu człowieka. T-2 toksyna, deoksyniwalenol a także satratoksyny G i H występują powszechnie w porażonych grzybem paszach i ziarnach zbóż. Ekspozycja na T-2 toksynę i HT-2 toksynę może skutkować zapaleniem skóry, zaczerwienieniem, martwicą, nudnościami, spadkiem masy ciała, zaburzeniami wzrostu i oddychania. Niektórym zatruciom towarzyszą omdlenia, zasłabnięcia, wymioty, biegunki, ataksje, szok a nawet śmierć (47). Trichoteceny poprzez leukopenię i obniżenie poziomu przeciwciał wpływają na obniżenie odporności organizmu, wykazują właściwości neurotoksyczne i kancerogenne (55). Satratoksyny produkowane przez *Stachybotrys chartarum* działają niekorzystnie na funkcjonowanie układu oddechowego i wiązane są z występowaniem „zespołu chorego budynku” (SDS – ang.) u mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń.

**Fumonizyny** wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, są dwusterami kwasu propano-1,2,3-trikarboksylowego i 2-amino-12, 16-dimetylo-3,5,10,14,15-pentahydroksykosanu lub jego C-10 deoksyanalogami (66). Budową chemiczną przypominają sfingozynę wchodzącą w skład sfingolipidów budujących błony biologiczne. Wykazano, że stanowią grupę naturalnych inhibitorów N-acylotransferazy sfinganinowej i N-acylotransferazy sfingozynowej, enzymów biorących udział w syntezie sfingolipidów i ceramidów. Stanowią one poważne zagrożenie zdrowia człowieka ze względu na częste występowanie w ziarnach kukurydzy. Charakteryzują się właściwościami kancerogennymi, immunotoksycznymi, cytotoksycznymi i neurotoksycznymi. Mogą upośledzać oddychanie i układ sercowo-naczyniowy. Mykotoksyny te są potencjalnie rakotwórcze i podobnie jak ochratoksyna A zostały wpisane przez IARC do grupy 2B. Przypisuje im się wywołanie nowotworów nosogardzieli u niektórych mieszkańców Afryki i Chin (55).

**Zearalenon** jest niesteroidową, estrogeną toksyną wykazującą właściwości hormonalne i estrogenopodobne, co wiąże się z powinowactwem do receptorów estrogenowych w tkankach układu rozrodczego. Dzięki obecności w swej strukturze pierścienia fenolowego, współzawodniczy z 17  $\beta$ -estradiolem i może łączyć się z receptorami estrogenów w macicy, pochwie, jajnikach i jajowodzie (30) prowadząc do zaburzeń funkcjonowania układu rozrodczego. Badania histopatologiczne wykazują także zmiany morfologiczne nadnercza, tarczycy i przysadki. Może mieć też szkodliwy wpływ na niektóre procesy oddechowe m. in. na oksydacyjną fosforylację (44). W latach 80 ubiegłego wieku pochodną zearalenonu – zearalenol podejrzewano o przyczynę zbyt wczesnego dojrzewania małych dziewczynek w Puerto Rico. Szacuje się, że około 50% naszej pszenicy dotkniętej fuzariozą jest skażona zearalenonem i jego metabolitami (30).

## SKUTKI ZDROWOTNE

Kontakt z zarodnikami pleśni, szczególnie u osób z nadwrażliwością, może prowadzić do występowania reakcji alergicznych, charakteryzujących się zaczerwienieniem, obrzękiem i zapaleniem błon śluzowych oczu i nosa. Przy ciągłym narażeniu na alergeny grzybów może dojść do utrzymywania się objawów u osób już uczulonych, a w konsekwencji, do zaostrzenia stanów alergicznych i rozwinięcia astmy oskrzelowej, często prowadzącej do niewydolności oddechowej, a nawet śmierci (9, 40). Bardzo małe rozmiary zarodników pleśni, rzędu 3-10  $\mu\text{m}$  sprawiają, że wnikają one głęboko do płuc, prowadząc do wystąpienia u około 1-20% osób z przewlekłą astmą tzw. aspergilozy oskrzelowo-płucnej, wywoływanej przez *Aspergillus fumigatus*. Reakcja zapalna organizmu wywołana przez proteazy grzybów, białka kationowe i cytokiny prowadzi do niszczenia komórek nabłonka tkanki płucnej skutkując przewlekłym zapaleniem oskrzeli, destrukcją i zwłóknieniem płuc (5, 13).

Inhalacja dużej liczby spor grzybowych w pyłe organicznym skutkuje rozwinięciem alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych (AZPP), określanym też jako zapalenie płuc z nadwrażliwości. Większość przypadków AZPP to choroby pochodzenia zawodowego (Tabela I). W ostrym przebiegu choroby, już po 4-8 godzinach od kontaktu z antygenem, mogą wystąpić pierwsze symptomy reakcji zapalnej – gorączka, dreszcze, kaszel i duszność. Zwykle po kilku godzinach od momentu usunięcia antygeny objawy ustępują, jednak ciągły, powtarzający się kontakt z grzybem może prowadzić do zwłóknienia płuc (35).

Tabela I. Grzyby będące najczęstszą przyczyną AZPP, źródła narażenia i nazwa jednostki chorobowej (64).

Gatunek grzyba	Źródło narażenia	Nazwa choroby
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Spleśniałe ziarna jęczmienia	Płuco pracowników browarów i słodowni
<i>Alternaria</i> sp.	Dąb, cedr, sosna, świerk, mahoń	Płuco stolarzy i pracowników papierni
<i>Aspergillus</i> sp.	Liście tytoniu	Płuco hodowców tytoniu
	kompost	Płuco kompostowników
<i>Botritis cinerea</i>	Pleśnie na winogronach	Płuco winiarzy
<i>Penicillium</i> sp.	Drewno, torf opałowy	AZPP indukowane materiałami opałowymi
<i>Penicillium casei</i>	Pleśnie serowe	Płuco serowarów
<i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp.	Zanieczyszczone skrawki drewna	Choroba leśników

Oprócz powyższych komplikacji stwierdzono związek między występowaniem pleśni a złym stanem zdrowia mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń, przejawiające się złym samopoczuciem i ogólnym spadkiem odporności organizmu. Określa się je mianem „zespołu chorego budynku” (Sick Building Syndrome – SBS) któremu towarzyszy chroniczne zmęczenie, osłabienie, bóle i zawroty głowy, kaszel, krótki oddech, kłopoty ze snem, dezorientacja, problemy z pamięcią, nudności i biegunka (63).

Innym aspektem zdrowotnym jest narażenie na wytwarzane przez pleśnie mykotoksyny, które znajdują się nie tylko w grzybni ale i w zarodnikach (7). Problem narażenia ludzi i zwierząt na spożycie mykotoksyn wraz z pożywieniem został dobrze opisany, jednak wiedza o mechanizmach oddziaływania i efektach zdrowotnych wynikających z ekspozycji na mykotoksyny drogą oddechową, wchłaniania przez skórę i błony śluzowe jest niedostateczna. Przeprowadzone dotychczas badania sugerują, że inhalacja toksyn może wywierać nawet dziesięciokrotnie silniejszy efekt toksyczny niż narażenie przez skórę i drogi pokarmowe, gdzie zachowanych jest większość reakcji obronnych organizmu (14). Związane jest to z łatwością przenikania mykotoksyn przez barierę naczyń włosowatych w pęcherzykach płucnych, bezpośrednio do krwioobiegu. Uważa się, że do zatrucia drogą oddechową potrzebna jest znacznie mniejsza dawka mykotoksyny, a toksyczne objawy pojawiają się gdy liczba zarodników we wdychanym powietrzu wynosi tysiąc w jednym metrze sześciennym (7, 65). W przypadku gdy w pomieszczeniach zamkniętych mamy do czynienia z mieszaniną wielu zarodników reakcja na toksyny grzybowe może wystąpić szybciej i silniej (27).

Do najgroźniejszych dla zdrowia człowieka mykotoksyn zaliczyć można aflatoksyny, ochratoksynę A, trichoteceny, satratoksyny, roridynę, verrakurynę, cytryninę oraz deoksynivalenol. Gatunki grzybów i wytwarzane przez nie toksyny przedstawiono w Tabeli II. Zawsze w przypadku narażenia na mikotoksyny mamy do czynienia z obniżeniem odporności organizmu. Wszystkie wykazują właściwości immunosupresyjne, cytotoksyczne i mają negatywny wpływ na tkanki układu pokarmowego, oddechowego, krwionośnego, rozrodczego, moczowego, nerwowego oraz skóry. Osłabieniu ulegają bariery ochronne organizmu co pociąga za sobą dalsze infekcje i podatność m. in. na nowotwory. Wieloletnie badania prowadzone przez *Aleksandrowicza* i *Smyka* (1) wykazały że u osób mieszkających w zagrzybionych domach umieralność na białaczkę była wyższa. Szczególnie dominował w nich *Aspergillus flavus*.



Tabela II. Główne grupy mikotoksyn i produkujące je grzyby (55).

Mikotoksyny	Główne gatunki grzybów produkujących mikotoksyny
Aflatoksyny B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ochratoksyna A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i>
T-2 toksyna HT-2 toksyna	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium solani</i>
Deoksyniwalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium sporotrioides</i> , <i>Fusarium poae</i>
Satratoksyny	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Werukaryna, rorydyna	<i>Myrothecium sp.</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>
Fumonizyny	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium solani</i>
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Bassolamys nivea</i>
Wersikoloryny	<i>Aspergillus versicolor</i>

Niektóre z toksycznych metabolitów grzybowych uwalniane są do powietrza pod postacią lotnych związków organicznych (VOC), o charakterze organicznych rozpuszczalników, głównie alkoholi, ketonów, węglowodorów i związków aromatycznych o nieprzyjemnym zapachu, wytwarzanych głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* (7). Związki te nawet w niskich stężeniach mogą działać drażniaco na błony śluzowe oczu i dróg oddechowych oraz prowadzić do ogólnego dyskomfortu psychicznego. W odpowiedzi na zatrucie metabolitami grzybów może dojść do opuchnięcia błon śluzowych, zwężenia mięśni oddechowych gładkich, rozszerzenia powierzchniowych naczyń krwionośnych, czy też do dezorientacji i zawrotów głowy w przypadku dłuższego narażenia (46).

## PODSUMOWANIE

Przez bardzo długi czas nie zdawano sobie sprawy z zagrożenia jakie niesie ze sobą występowanie pleśni w najbliższym otoczeniu człowieka. Obecnie, dzięki przeprowadzonym badaniom, poznano optymalne warunki dla rozwoju grzybów i produkcji mykotoksyn oraz oszacowano ich szkodliwość. Zbadano budowę, poznano szlaki biosyntezy, rozkładu i wydalania ich z organizmu. Zaczęto zwracać większą uwagę na warunki higieny pracy i higienę warunków mieszkaniowych. Określono nieprzekraczające norm stężenia mykotoksyn w żywności i w pomieszczeniach zamkniętych. Wciąż doskonałe są właściwe technologie dotyczące higieny zbioru płodów rolnych oraz metody ich konserwacji i ewentualnej detoksykacji. Poszukiwane są odmiany roślin odpornych na infekcje grzybowe. Różnorodność skutków wywołanych przy narażeniu na pleśnie i ich toksyny powinno być przedmiotem zainteresowania nie tylko alergologów, pulmonologów i dermatologów. O zagrożeniu i skutkach ekspozycji powinni pamiętać także toksykolodzy, lekarze weterynarii i specjaliści od medycyny pracy.

**Podziękowania:** Zdjęcia do pracy wykonane zostały w Samodzielnym Zakładzie Biologii Mikroorganizmów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Szczególne podziękowania składam Pani dr Hannie Rekosz-Burlaga.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Aleksandrowicz J, Smyk B.* Mykotoksyny i ich rola w onkogenezie ze szczególnym uwzględnieniem chorób krwi. *Med Wet* 1970; 10: 600-4.
2. *Abba I, Terr J.* Are indoor molds causing a new disease?  *allergy Clin Immunol* 2004; 2: 221-6.
3. *Barabasz W, Jaśkowska M.* Aspekty zdrowotno-toksykologiczne występowania grzybów pleśniowych w budynkach mieszkalnych i inwentarskich. Materiały II Konferencji Naukowej: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź, maj 30-1, 2001; 86-94.
4. *Baran E.* Grzyby jako alergeny górnych dróg oddechowych.  *Alergia* 2001; 13-4.
5. *Becker JW, Burke W, McDonald G* i inni. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in adult patients with cystic fibrosis.  *Chest* 1996; 109: 1536-40.
6. *Borges V, Vital HC, Maia MCA* i inni. Morphological changes of *Aspergillus ochraceus* irradiated on peanut grains. International Nuclear Atlantic Conference – INAC, Belo Horizonte MG. Brazil, Oct 2011; 24-8. ISBN: 978-85-99141-04-5.
7. *Buchmiet E, Żakowska Z.* Mikotoksyny w konidiach pleśniowych. Materiały III Konferencji Naukowej: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź, wrzesień 8-10, 2003; 238-42.
8. *Buczyńska A, Cyprowski M, Piotrowska M* i inni. Grzyby pleśniowe w powietrzu pomieszczeń biurowych – wyniki interwencji środowiskowej.  *Med Pr* 2007; 58: 521-5.
9. *Busch R, Portnoy J.* The role and abatement of fungal allergens in allergic disease.  *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 430-40.
10. *Chazalet V, Debeauvais JP, Sarfati J* i inni. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings.  *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1494-1500.
11. *Chelkowski J.* Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy. Wydawnictwo SGGW. Warszawa 1985; 11-50.
12. *Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS.* Airborne outbreak of trichotecene mycotoxicosis.  *Atmos Environ* 1986; 20: 549-52.
13. *Dagenais T, Keller P.* Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis.  *Clin Microbiol Rev* 2009; 447-65.
14. *Dahm H, Redlak K.* Mikotoksyny. Drobnoustroje środowiska glebowego, aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne. Wydawnictwo Uniwersytetu M. Kopernika. Toruń 2001; 25-36.
15. *Deaning DW.* Therapeutic outcome in invasive aspergillosis.  *Clin Infect Dis* 1995; 23: 608-14.
16. *Denning DW.* Invasive aspergillosis.  *Clin Infect Dis* 1998; 26: 781-805.
17. *Dixon DD, Walsch TJ.* Human pathogenesis 1992; 249-267.
18. *Dixon DM, Mc Nell MM, Cohen M* i inni. Fungal infections: a growing threat.  *Public Health Rep* 1996; 111: 226-36.
19. *Dutkiewicz J, Krysińska Traczyk E, Skórska C* i inni. Mikroflora powietrza tartaków jako potencjalny czynnik zagrożenia zawodowego: stężenie i skład mikroflory oraz immunologiczna reaktywność pracowników na aeroalergeny drobnoustrojowe.  *Pneumonol Alergol Pol* 1996; 64 Supl. 1: 25-31
20. *Fassatiwa O.* Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. WNT. Warszawa 1983; 125-236.
21. *Frisuad JC, Smedsgaard J, Larsen TO* i inni. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*.  *Stud Mycol* 2004; 49: 201-41.
22. *Garrett MH, Baverley MH, Cole FM* i inni. Airborne fungal spores in 80 homes in the Latrobe Valley, Australia: levels, seasonality and indoor – outdoor relationship.  *Aerobiologia* 1997; 13: 121-6.
23. *Gniadek A.* Cytotoxicity of *Aspergillus* fungi as a potential infections threat, Insight and Control of Infections Disease in Global Scenario. Dr. Roy Priti (ed.). 2012. ISBN: 978-953-51-0319-6, In Tech.
24. *Grajewski J, Twarużek M.* Zdrowotne aspekty oddziaływania grzybów pleśniowych i mikotoksyn.  *Alergia* 2004; 45-9.
25. *Grajewski J.* Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Zagrożenie dla człowieka i zwierząt. Wydawnictwo Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego. Bydgoszcz 2006; 17-33.

26. Górny R, 2004: Biologiczne czynniki szkodliwe: normy, zalecenia i propozycje wartości dopuszczalnych. PiMOSP 2004; 3: 17-39.
27. Gutarowska B. Grzyby strzępkowe zasiedlające materiały budowlane. Wzrost oraz produkcja mikotoksyn i alergenów. PŁ 2010. Zeszyty Naukowe nr 1074.
28. Halmes J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. Biocycle 1995; 6: 32-5.
29. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA i inni. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology. 2007; 153: 1677-92.
30. Jakimiuk E, Sikorska-Wyszyńska E, Gajęcka M. i inni. Zearalenon – fuzariotoksyna zanieczyszczająca materiały paszowe pochodzenia roślinnego. Trzoda chlewna 2004; 12: 57-63.
31. Johanning E, Biagini R, Hull D i inni. Health and immunology following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water damaged office environment. Int. Arch. Occ. Hea. 1996; 68: 207-18.
32. Kluczek PJ, Kojder A. Mikotoksyny w zarysie. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Tech-Rol. Bydgoszcz 2000; 54-181.
33. Kotowski K. Mikotoksykozy świń – problem higieniczno-zdrowotny. Trzoda chlewna 2004; 08/09: 178-83.
34. Krysińska-Traczyk E. Alergizujące i toksynotwórcze grzyby pleśniowe w rolniczym środowisku pracy. Materiały II Konferencji Naukowej: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź, Maj 30-31, 2001; 95-97.
35. Krysińska-Traczyk E, Perkowski J, Kostecki M i inni. Grzyby pleśniowe i mikotoksyny jako potencjalne czynniki zagrożenia zawodowego rolników sprzątających zboże kombajnami. Med Pr 2003; 54: 133-138.
36. Lipiec A, Myszkowska D, Rapiejko P i inni. Analiza stężenia zarodników *Cladosporium* w wybranych miastach Polski w 2006r. Alergoprofil 2007; 1: 37-43.
37. Mędreła-Kuder E. Występowanie zarodników grzybów pleśniowych w powietrzu atmosferycznym na terenie Krakowa z uwzględnieniem zanieczyszczenia pyłowego. Arch Ochr Środow 1999; 25: 63-70.
38. Nabrdalik M. Grzyby strzępkowe w obiektach budowlanych. Proceedings of ECOpole 2007; No. 1/2.
39. Neukirch C, Henry Ch, Leynaert B i inni. Is sensitization to *Alternaria alternata* a risk factor for severe asthma? J Allergy Clin Immunol 1999; 709-11.
40. Nielsen KF, Thrane U, Larsen TO i inni. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. Int Biodeter Biodegr 1998; 42: 9-16.
41. Nielsen KF. Mycototoxin production by indoor molds. Fungal Genet Biol 2003; 39: 103-17.
42. Nikulin M, Pasanen AL, Berg S i inni. *Stachybotrys atra* growth and toxin production in some buildings materials and fodder under different relative humidities. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 3421-24.
43. Nyongesa BW, Okoth S, Ayugi V. Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya. Adv Microbiol 2015; 5: 205-29.
44. Obremski K, Gajęcki M, Otrocka-Domagala I i inni. Przypadek mikotoksykozy zearalenonowej królików. Med Wet 2005; 61: 458-61.
45. Obremski K, Gajęcki M, Zwierzchowski W i inni. The level of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in the blood of gilts with clinical symptoms of toxicosis, fed diets with a low zearalenone content. J Anim Feed Sci 2003; 12:529-38.
46. Otto D, Molhave L, Rose G i inni. Neurobehavioral and sensory effects of controlled exposure to a complex mixture of volatile organic compounds. Neurotoxicol Teratol 1989; 12: 649-52.
47. Pascale M, Haidukowski M, Visconti A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthrolylnitrile. J Chromatogr 2003; 989: 257-64.
48. Piontek M. Pleśnie występujące w obiektach budowlanych w województwie lubuskim. Materiały II Konferencji Naukowej: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź, Maj 30-1, 2001; 86-94.

49. Piontek M. Grzyby pleśniowe. Atlas. Wydawnictwo Politechniki Zielonogórskiej. Zielona Góra 1999; 7-97.
50. Popiel D, Kwaśna H, Chelkowski J i inni. Impact of selected antagonistic fungi on *Fusarium* species – toxigenic cereal pathogens. Acta Mycol 2008; 43: 29–40.
51. Postupolski J. Dopuszczalne poziomy zawartości mikotoksyn w zbożach i ich przetworach w świetle wymagań Unii Europejskiej. Prz Zboż Młyn 2005; 11: 13-5.
52. Ramos AJ, Labernia N, Marin S i inni. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on barley extract medium and on barley grains. Int J Food Microbiol 1998; 44: 133-40.
53. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, company Baltimore, Maryland 1965.
54. Rekosz-Burlaga H, Garbolińska M, Mierzejewski D i inni. Mikroflora powietrza pomieszczeń archiwalnych. Materiały III Konferencji Naukowej: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź, wrzesień 8-10, 2003; 260-264.
55. Rybińska K, Postupolski J. Mikotoksyny w żywności – zagrożenia i metody analityczne. Prace IŻŻ 2003; 104: 229-40.
56. Schoemaker RC, House DE. Sick building syndrome (SBS) and exposure to waterdamaged buildings: Time series study, clinical trial and mechanisms. Neurotoxicol Teratol 2005; 28: 573-88.
57. Scott PM. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A. Food Addit Contam 1996; 13: 19-21.
58. Shiefer HB, Hancock DS. Systemic effects of topical application of T-2 toxin in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1984; 76: 464-72.
59. Soroka PM, Cyprowski M, Szadkowska-Stańczyk I. Narażenie zawodowe na mykotoksyny w różnych gałęziach przemysłu. Med Pr 2008; 59: 333-45.
60. Steyn PS. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicol Lett 1995; 82/83: 843-51.
61. Sudahn DL. Trichotecenes in the environment: relevance to human health. Toxicol Lett. 2003; 143: 97-107.
62. Topley & Wilson's. Microbiology and microbial infections. Oxford university Press. 1988; 4: 11-13.
63. Twarużek M, Grajewski J. Pleśnie i mikotoksyny w środowisku bytowania człowieka i zwierząt. Przeg Hod 2002; 5: 21-4.
64. Tyczkowska-Sieroń E, Bartoszko-Tyczkowska A. Zakażenia *Candida* oraz *Aspergillus* w świetle nowej listy czynników alarmowych na przykładzie Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr.1 w Łodzi. Med. Dośw 2012; 64 (3): 245-53.
65. Wiszniewska M, Walusiak J, Gutarowska B i inni. Grzyby pleśniowe w środowisku komunalnym i w miejscu pracy – istotne zagrożenie zdrowotne. Med Pr 2004; 55: 257-66.
66. Wiśniewska-Dmitrow H, Kozak A, Żmudzi J. Fumonizyny: charakterystyka chemiczna, działanie biologiczne i znaczenie. Med Wet 1996; 52: 159-62.
67. Varweij PE, Dompeling EC, Donnelly JP i inni. Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of invasive aspergillosis with two examples. Infection 1997; 25: 86-9.
68. Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC i inni. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Stud Mycol 78: 343-71.
69. Vujanovic V, Smoragiewicz W, Krzysztyniak K. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. Environ Toxicol 2001; 16: 1-8.

Otrzymano: 5 IV 2016 r.

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

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

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

### **I. Zasady obowiązujące przed skierowaniem artykułu do publikacji.**

#### **1. Autorzy**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Powtórna publikacja

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

## II. Instrukcja dotycząca przygotowania artykułu.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

W wykazie piśmiennictwa należy zachować następującą kolejność:

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

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

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

Przykłady:

Artykuł z czasopisma medycznego:

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

Książki i monografie

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



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

### **Tabele**

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

### **Ryciny**

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

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

### **Objętość artykułów**

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

### **Zasady ogólne**

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

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

