

MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

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

3-4

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

- A.A. Zasada, M.Rzeczowska, T. Wołkowicz, K. Formińska, K. Zacharczuk, N. Wolaniuk, O. Paduch, E. Badell, A. Januszkiewicz, N. Guiso. Charakterystyka klinicznych izolatów *Corynebacterium diphtheriae* pochodzących z różnych zakażeń na podstawie profili białek pełnokomórkowych 161
- M. Pawelec, J. Skrzeczyńska, H. Połowniak-Pracka, A. Magdziak, E. Waker, A. Woźniak, K. Hass. Kolonizacja przewodu pokarmowego szczepami wieloopornymi u pacjentów hospitalizowanych w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie 167
- E. Waker, H. Połowniak-Pracka, R. Krajewski, M. Pietras, A. Woźniak, K. Hass, A. Magdziak, M. Pawelec, J. Skrzeczyńska. Etiologia zakażeń towarzyszących nowotworowym zmianom narządów w obszarze głowy i szyi pacjentów hospitalizowanych w Centrum Onkologii w Warszawie w latach 2008-2012 175
- W. Rastawicki, K. Śmietańska, A. Chróst, K. Gielarowicz, T. Wołkowicz. Wykorzystanie wybranych, rekombinowanych białek w serodiagnostyce zakażeń wywoływanych przez werotoksyczne pałeczki *Escherichia coli* (VTEC) u ludzi 183
- K. Brodzik, E. Augustynowicz. Genotypowanie szczepów *Clostridium perfringens* izolowanych od chorych z objawami zatrucia pokarmowego oraz próbek żywności 191
- S. Jarzynka, M. Przybylski, A. Sulowska, M. Gołaś, T. Dzieciatkowski, M. Wróblewska. Częstość wykrywania antygenów rozpuszczalnych *Candida* sp. I *Aspergillus* sp. metodami serologicznymi w płynach ustrojowych pacjentów Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie 203

PRACE POGLĄDOWE

- K. Gielarowicz. *Helicobacter pylori* – charakterystyka drobnoustroju, patogenezą i mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń 223
- M. Prygiel, E. Mosiej, A.A. Zasada. Szczepienia kobiet w ciąży 225

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- A.A. Zasada, M. Rzeczowska, T. Wołkowicz, K. Formińska, K. Zacharczuk, N. Wolaniuk, O. Paduch, E. Badell, A. Januszkiewicz, N. Guiso. Whole cell protein profiling characterization of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates collected from various infections 161
- M. Pawelec, J. Skrzeczyńska, H. Połowniak-Pracka, A. Magdziak, E. Waker, A. Woźniak, K. Hass. The colonization of the digestive tract multidrug-resistant strains hospitalized patients in Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology 167
- E. Waker, H. Połowniak-Pracka, R. Krajewski, M. Pietras, A. Woźniak, K. Hass, A. Magdziak, M. Pawelec, J. Skrzeczyńska. Etiology of infection associated with neoplastic changes of organs in the head and neck in patients hospitalized in the Oncology Centre in Warsaw 175
- W. Rastawicki, K. Śmietańska, A. Chróst, K. Gielarowicz, T. Wołkowicz. Use of selected recombinant proteins in serodiagnosis of infections caused by verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in humans 183
- K. Brodzik, E. Augustynowicz. Genotyping *Clostridium perfringens* strains isolated from patients with symptoms of food poisoning and food samples
- S. Jarzynka, M. Przybylski, A. Sulowska, M. Gołaś, T. Dzieciatkowski, M. Wróblewska. Frequency of detection of soluble antigens of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. using serological assays in body fluids of patients of Central Clinical Hospital in Warsaw 203

REVIEWS

- K. Gielarowicz. *Helicobacter pylori* – characteristics of pathogen, pathogenesis and microbiological diagnosis of infections 223
- M. Prygiel, E. Mosiej, A.A. Zasada Vaccination during pregnancy 225

Whole cell protein profiling characterization of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates collected from various infections

Charakterystyka klinicznych izolatów *Corynebacterium diphtheriae* pochodzących z różnych zakażeń na podstawie profili białek pełnokomórkowych

Aleksandra A. Zasada¹, Magdalena Rzczkowska², Tomasz Wołkowicz², Kamila Formińska¹, Katarzyna Zacharczuk², Natalia Wolaniuk², Olga Paduch², Edgar Badell³, Aleksandra Januszkiewicz², Nicole Guiso³

¹National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene,
Department of Sera and Vaccines Evaluation, Warsaw, Poland

²National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene,
Department of Bacteriology, Warsaw, Poland

³Institut Pasteur,
Molecular Prevention and Therapy of Human Diseases Unit, Paris, France

***Corynebacterium diphtheriae* posiada zdolność wywoływania zarówno miejscowych jak i inwazyjnych zakażeń. W niniejszej pracy przedstawiono porównanie profili białek pełnokomórkowych uzyskanych z klinicznych izolatów *C. diphtheriae* pochodzących z błonicy, zakażeń inwazyjnych i miejscowych oraz od bezobjawowych nosicieli wyosobnionych w Polsce, Francji, Nowej Kaledonii i Kanadzie w latach 1950-2014. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy rodzajem zakażenia, z którego pochodził izolat a profilem białek.**

Słowa kluczowe: *Corynebacterium diphtheriae*, białka pełnokomórkowe, zakażenia inwazyjne, błonica

ABSTRACT

Introduction: *Corynebacterium diphtheriae* can cause various infections such as diphtheria, wound infections, septic arthritis, bacteraemia and endocarditis. Different virulence properties of the isolates might be related to different virulence factors expressed by the isolates. The objective of this study was to explore whether whole cell protein profiling might be useful in prediction of pathogenic properties of *C. diphtheriae* isolates.

Methods: *C. diphtheriae* isolates collected from diphtheria, invasive and local infections and from asymptomatic carriers in Poland, France, New Caledonia and Canada in 1950-2014 were investigated using whole cell protein profile analysis.

Results: All the examined isolates were divided into two clades: A and B with similarity about 47%, but clade B was represented by only one isolate. The clade A was divided in two subclades A.I and A.II with similarity 53,2% and then into four groups: A.Ia, A.Ib, A.Ic and A.Id. The comparative analysis did not distinguish clearly toxigenic and nontoxigenic isolates as well as invasive and noninvasive isolates.

Conclusions: Whole cell protein profile analysis of *C. diphtheriae* exhibits good concordance with other genotyping methods but this method is not able to distinguish clearly invasive from non-invasive isolates.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*, whole cell proteins, invasive infection, diphtheria

INTRODUCTION

Corynebacterium diphtheriae, an important human pathogen, is known to cause diphtheria as well as invasive infections such as bacteraemia and endocarditis. Diphtheria is caused by toxin-producing *C. diphtheriae* strains whereas invasive infections are caused mostly by nontoxigenic strains. The microorganism is divided into four biotypes namely *gravis*, *mitis*, *intermedius* and *belfanti*. All the biotypes are able to produce diphtheria toxin, but toxin producing *belfanti* are extremely rare. It is supposed that *C. diphtheriae* strains, which are able to cause invasive infections, express additional, still unknown, virulence factors (4, 12). Analysis of whole genome sequences of 13 *C. diphtheriae* isolates from various infections revealed that the number of predicted protein coding genes varies from 2196 to 2402. The core genome of the strains was estimated to comprise 1632 genes that are highly conserved in this species, whereas about 30% of the gene content of *C. diphtheriae* strains belongs to the accessory genome (12). Many of them encode hypothetical proteins with unknown functions. Some of these proteins might be related to pathogenic properties of the strains such as invasiveness.

The objective of this study was to explore whether whole cell protein profiling might be useful in prediction of pathogenic properties and relationship among *C. diphtheriae* isolates.

MATERIALS AND METHODS

A total of 67 clinical isolates of *C. diphtheriae* collected in Poland, France, New Caledonia and Canada between 1950 and 2014 were used in this study, including 22 toxigenic isolates, collected from diphtheria cases, 31 nontoxigenic from invasive infections, 9 nontoxigenic from local infections and 5 nontoxigenic from asymptomatic carriers. Most of the isolates were genotyped using MLST (1, 5) or other methods (PCR MP, PFGE, ERIC PCR, REP-PCR) (14, 15).

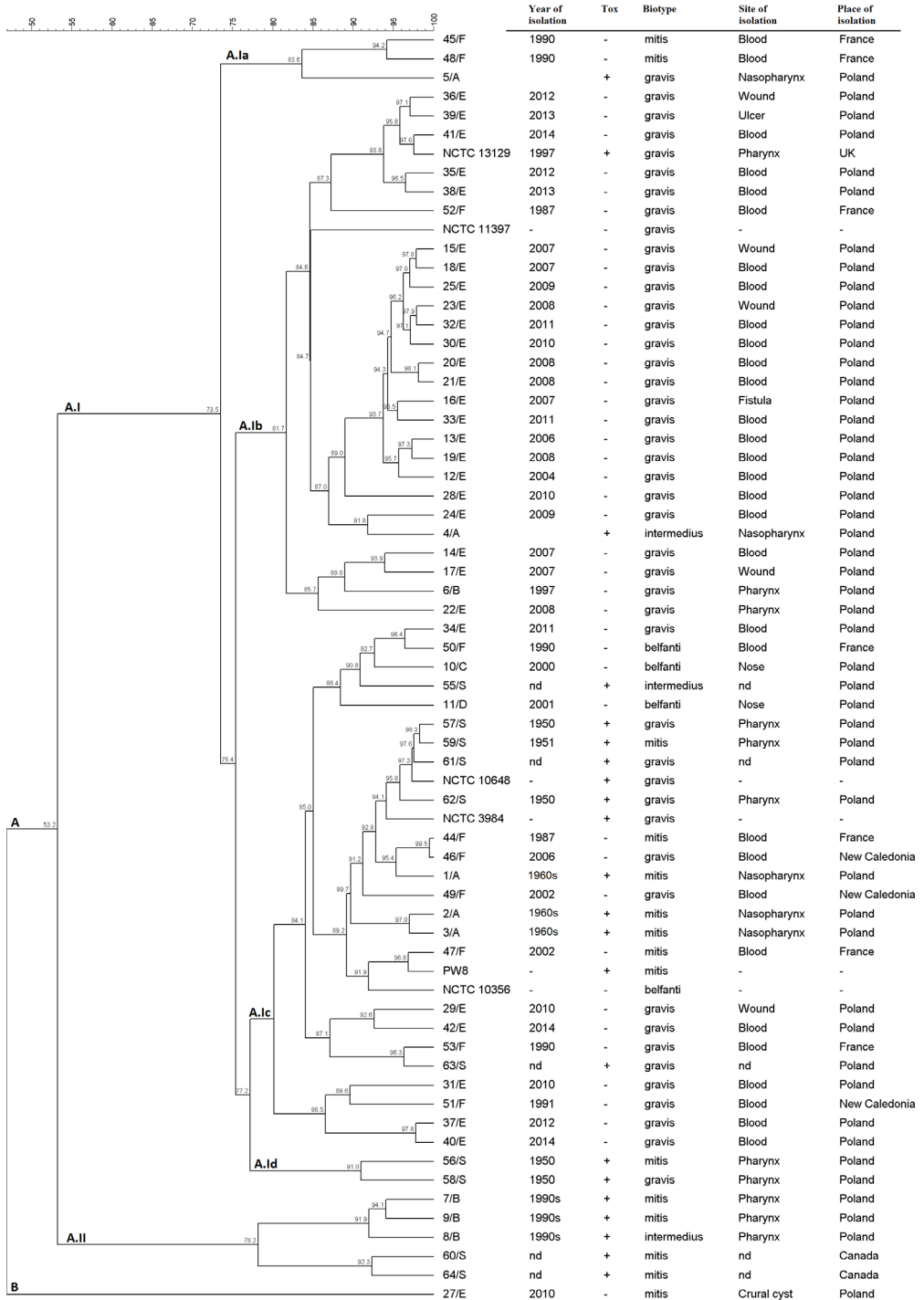


Figure 1. Comparative analysis of the investigated clinical isolates based on the whole protein profiles.

For the extraction of whole cell proteins, bacterial cells suspensions of 12-14 McFarland in saline were used. The cells were lysed by treatment with 5 mg/ml of lysozyme (Sigma-Aldrich) for 2 hours at 37°C. Protein samples were treated with sample buffer (0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol and 0,001% bromophenol blue) and denatured by heating at 100°C for 15 min. Total crude cell lysates were cleared by centrifugation at 14000xg for 5 min. The supernatants were collected and submitted to electrophoresis on 12,5% polyacrylamide gels (SDS-12,5% PAGE) (Bio-Rad). The protein profiles were observed after staining with Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad).

Data analysis was performed with BioNumerics v6.6 (Applied Maths, Belgium). The dendrogram was constructed by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the Pearson correlation (with an optimization and curve smoothing equals 1,5% and 1% respectively). For the analysis only protein bands >15 kDa were considered because bands present in the lower region of the SDS-PAGE gels did not resolve well.

RESULTS AND DISCUSSION

SDS-PAGE analysis of whole cell proteins has been shown to be useful for discriminating various bacteria at a species level as well as for studying strain diversity (3, 7, 8, 10, 11, 13). In presented work we investigated toxigenic and nontoxigenic *C. diphtheriae* isolated from invasive and non-invasive infections. Comparative analysis of *C. diphtheriae* whole-cell protein profiles, conducted in our study, divided all the examined isolates into two clades: A and B (Fig. 1). Surprisingly, the clade B was represented by one isolate only. This isolate was collected from serous contents of crural cyst in Poland in 2010. It is the only *mitis* isolates genetically unrelated to other *C. diphtheriae* collected in Poland since 2004. The clade A was divided in two subclades A.I and A.II with similarity 53,2%. Subclade A.II included three toxigenic isolates collected in 1990s in Poland and two toxigenic isolates from Canada, whereas subclade A.I comprised most of the investigated isolates and was divided into four groups: A.Ia, A.Ib, A.Ic and A.Id. The group A.Ia comprised only two invasive isolates from France and one diphtheria isolate from Poland, with similarity 83,6%. The group A.Ib was highly monomorphic and comprised only isolates belonging to biotype *gravis*, except one *intermedius*, and 23 from 29 nontoxigenic isolates collected in Poland in 2004-2014, which were genetically indistinguishable using various genotyping methods (1, 5, 14). The rest 6 of the Polish isolates from 2004-2014 were included into the group A.Ic together with 7 invasive isolates from France and New Caledonia and toxigenic and nontoxigenic isolates collected in Poland before 2002. Similarity of this group was estimated on 80,1%. The smallest group A.Id comprised two toxigenic isolates from 1950. Results of the comparison analysis based on whole cell protein profiles were consistent with results obtained with other genotypic methods (1, 5, 14, 15).

In silico analysis of the *C. diphtheriae* NCTC 13129 complete genome sequence available in GenBank (accession no. NC_002935.2) revealed 1999 proteins with molecular weights ranging from 4,6 kDa to 315,53 kDa. 519 of them are annotated as hypothetical proteins derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology. As the function of these proteins is unknown we suppose that at least some of them are virulence factors necessary for invasive properties of the isolate. *Hirata*

et al. (6) investigating 5 invasive *C. diphtheriae* isolates noticed that the isolates revealed a particular protein profile distinct from those presented by isolates from diphtheria patients. This observation supported our hypothesis that invasive isolates should present specific bands in protein profiles. However, our study conducted on 67 isolates, including 31 collected from invasive infections, showed that the whole cell protein analysis did not allow to clearly identified invasive isolates. Nevertheless, we cannot excluded that isolates from local infections clustered together with invasive isolates did not possess invasive properties. Development of invasive infection may depend not only on bacterial features but also on properties of a host organism. It is also possible that some proteins, specific only for invasive isolates, are poorly visible in whole cell protein profiles. Moreover, it must be kept in mind that some proteins are expressed only under special conditions (e.g. iron-limited conditions) (2).

It conclusion, whole cell protein profile analysis of *C. diphtheriae* exhibits good concordance with MLST, PFGE, PCR MP, ERIC PCR and REP-PCR, what make it suitable adjunct tool for typing as well as for confirmation of results obtained by genotyping. But this method is not able to distinguish clearly invasive from non-invasive isolates.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to prof. Anna Lutyńska for providing them with 10 *C. diphtheriae* strains. This research was supported by the NIPH-NIH internal-grant (no. 3/EM/2015) and by donations from BNP Paribas.

REFERENCES

1. Bolt F, Cassidy P, Tondella ML et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol 2010; 48: 4177-85.
2. de Oliveira Moreira L, Andrade AFB, Vale MD et al. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 5907-13.
3. Dos Santos O, de Resende MCC, de Mello AL. The use of whole-cell protein profile analysis by SDS-PAGE as an accurate tool to identify species and subspecies of coagulase-negative staphylococci. APMIS 2011; 120: 39-46.
4. Encias F, Marin MA, Ramos JN et al. Genomic analysis of a nontoxicogenic, invasive *Corynebacterium diphtheriae* strain from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110: 817-9.
5. Farfour E, Badell E, Zasada A et al. Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. J Clin Microbiol 2012; 50: 173.
6. Hirata Jr. R, Pereira GA, Filardy AA et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. Braz J Med Biol Res 2008; 41: 986-91.
7. Mallik S, Viridi JS. Whole cell protein profiling reiterate phylogenetic relationships among strains of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A as discerned earlier by different genotyping methods. J. Appl. Microbiol. 2010; 109: 946-52.
8. Massa R, Bantar C, Lopardo H et al. Whole-cell protein profiles are useful for distinguishing enterococcal species recovered from clinical specimens. Revista Argent Microbiol 2007; 39: 199-203.

9. Patey O, Bimet F, Riegel P et al. Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. Coryne Study Group. J Clin Microbiol 1997; 35: 441-5.
10. Sánchez I, Seseña S, Palop L. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. Int J Food Microbiol 2003; 82: 181-9.
11. Sazakli E, Leotsinidis M, Vantarakis A et al. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis. J Appl Microbiol 2005; 99: 1191-203.
12. Trost E, Blom J, de Castro Soares S et al. Pangenomic Study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genome diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. J Bacteriol 2012; 194: 3199-215.
13. Vandamme P, Torck U, Falsen E et al. Whole-cell protein electrophoretic analysis of viridans streptococci: evidence for heterogeneity among *Streptococcus mitis* biovars. Int J Syst Bacteriol 1998; 48: 117-25.
14. Zasada AA, Baczevska-Rej M, Wardak S. An increase in non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. Int J Infect Dis 2010; 14: 907-12.
15. Zasada AA, Formińska K, Wolkowicz T et al. The utility of the PCR melting profile technique for typing *Corynebacterium diphtheriae* isolates. Lett Appl Microbiol 2014; 59: 292-8.

Received: 15 IX 2016 r.

Author's Address: 00-791 Warsaw, Chocimska 24, Poland, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene Department of Sera and Vaccines Evaluation Tel. +48 22 5421212, Fax: +48 22 8497484, e-mail: azasada@pzh.gov.pl

Kolonizacja przewodu pokarmowego szczepami wieloopornymi
u pacjentów hospitalizowanych w Centrum Onkologii
- Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie

The colonization of the digestive tract multidrug-resistant
strains hospitalized patients in Maria Skłodowska-Curie
Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology.

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

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

Celem pracy była retrospektywna ocena obecności wieloopornych szczepów we florze przewodu pokarmowego pacjentów Centrum Onkologii w Warszawie. Analizie poddano szczepy izolowane z kału i wymazów z odbytu pacjentów hospitalizowanych w klinikach Centrum Onkologii od 01.01.2010 r. do 30.09.2015 r. Do najczęściej izolowanych wieloopornych szczepów należały pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, produkujące β -laktamazy, głównie typu ESBL. Wśród wyizolowanych szczepów 31 (9,0%) stanowiły szczepy *Klebsiella pneumoniae*, 28 (74%) szczepy *E. coli*, a także stanowiące istotny problem, szczepy *Enterococcus faecium* VRE (21,15%).

Słowa kluczowe: *szczepy wielooporne, mechanizmy oporności, kolonizacja, przewód pokarmowy*

ABSTRACT

Introduction: The aim of the study was a retrospective analysis of intestinal flora for the presence of multidrug-resistant strains, isolated from patients hospitalized in clinics Oncology Center from 01.01.2010 to 30.09.2015 r.

Methods: The multi-resistant strains were isolated from stool and rectal swabs. In order to increase the potential of multiple-resistant strains, the material was plated on the appropriate substrate. Determination of resistance mechanisms performed by general recommendations.

Results: Results of this study showed among isolated multiple-resistance strains a high proportion of *Enterobacteriaceae* strains producing β -lactamase, mainly ESBL. *Klebsiella pneumoniae* consist of 31.9% of isolated strains, *E. coli* 28.74% and *Enterococcus faecium* VRE - 21.15%.

Conclusions: It is important to determine the microbiological status of hospitalized patients because colonized gastrointestinal tract multi-resistant strains may be one of the sources of serious infections.

Key words: multi-drug, resistance strains, resistance mechanism, colonization, gastrointestinal tract

WSTĘP

W dobie zwiększonego stosowania antybiotyków w leczeniu zakażeń zarówno w szpitalach jak i w podstawowej opiece zdrowotnej pojawił się problem oporności bakterii na szereg grup antybiotyków. Są to wielooporne szczepy posiadające różne mechanizmy oporności (12, 14). Najwięcej problemów w szpitalach całego świata sprawiają metacylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA), pałeczki Gram-Ujemne, produkujące β -laktamazy typu ESBL (o rozszerzonym spektrum substratowym), karbapenemazy typu MBL (metalo- β -laktamazy), NDM (New Delhi metallo- β -lactamases-1) i KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Wśród ziarenkowców, od wielu już lat, istotny problem stanowią szczepy z rodzaju *Enterococcus* oporne na wankomycynę (VRE) (11, 16, 17).

U pacjentów onkologicznych czynnikiem predysponującym do kolonizacji florą wielooporną, która często staje się źródłem zakażenia, jest długotrwały pobyt w szpitalu, inwazyjne techniki diagnostyczne i lecznicze, a także neutropenia (3, 5, 7, 8, 11, 17).

Celem pracy była retrospektywna ocena flory przewodu pokarmowego pod kątem obecności szczepów wieloopornych izolowanych od hospitalizowanych pacjentów w klinikach Centrum Onkologii w latach 2010-2015.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem analizy były wyniki 9902 posiewów kału i wymazów z odbytu, pobranych od 4801 pacjentów hospitalizowanych w klinikach Centrum Onkologii w okresie od 01.01.2010 do 30.09.2015 roku. Z próbek tych wyizolowano łącznie 2032 wieloopornych szczepów.

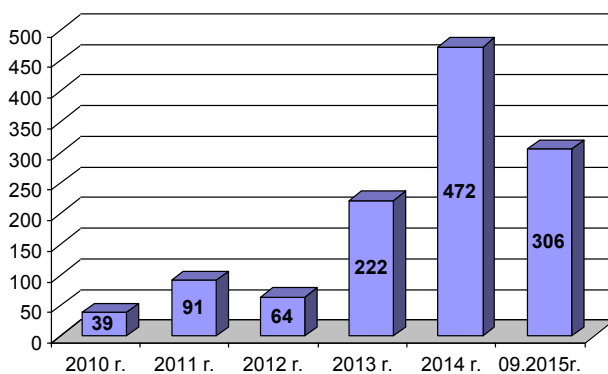
Prowadzono poszukiwania:

1. Metacylinoopornych szczepów *S. aureus* - MRSA
2. Wankomycinoopornych szczepów z rodzaju *Enterococcus* - VRE
3. Pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym o cefalosporyny III i IV generacji oraz monobaktamy (ESBL).
4. Szczepów: *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia sp.* oraz *Hafnia alvei* z derepresją genu *ampc*.
5. Szczepów *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp.*, mogących wytwarzać cefalosporynazy nabyte (HL-AmpC) (2, 4, 6, 12, 15).
6. Pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, wytwarzających karbapenemazy typu KPC oraz szczepów NDM.
7. Szczepów *Pseudomonas sp.* oraz *Acinetobacter sp.*, wytwarzających metalo- β -laktamazy (MBL).

Szczepy identyfikowano, stosując testy firmy bioMerieux; ID 32 Staph, Api Staph, ID 32 E, Rapid ID 32E, ID 32GN, API 20E, Api 20NE w systemie ATB Expression oraz karty GP, GN w systemie VITEC 2 Compact firmy bioMerieux. Dodatkowo, gronkowce identyfikowano testem „Clumping Factor” firmy Oxoid, stosując królicze osocze firmy Biomed do oznaczania koagulazy niezwiązanej oraz oznaczano zdolność do wytwarzania DNA-zy.

Do identyfikacji *Enterococcus* stosowano podłoże z telurem potasu oraz test na obecność enzymu L-pyrolidonyloaryloamidazy (PYR), a także podłoże do oznaczania ruchliwości.

W 2012 roku w Centrum Onkologii wprowadzono screening w kierunku obecności VRE. Materiał posiewano na podłoża chromogenne VRE- firmy BioMerieux oraz bulion z wyciągiem mózgowo-sercowym, w którym umieszczono krążek z wankomycyną 5µg. W kolejnym roku, wprowadzono screening w kierunku obecności pałeczek wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym. Próbkę materiału posiewano na podłoże chromogenne ESBL firmy bioMerieux.

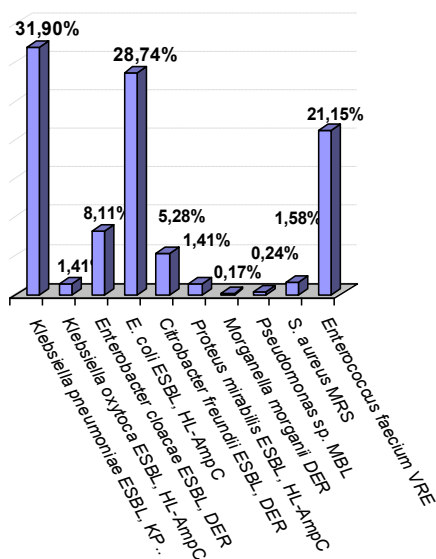


Ryc. 1. Liczba szczepów wieloopornych izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w klinikach Centrum Onkologii w latach 2010-2015.

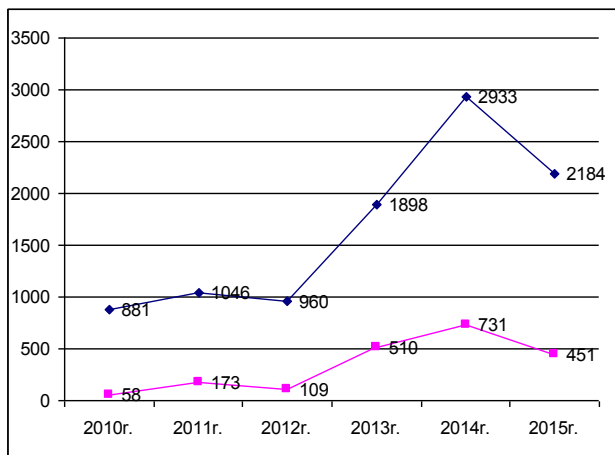
Oznaczenie mechanizmów oporności wykonano wg. zaleceń KORLD (Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów). Ponadto, w kierunku szczepów wytwarzających karbapenemazy (KPC, MBL, NDM) wykonywano test carba-NP.

WYNIKI

Przedmiotem badań było 2032 wieloopornych szczepów. Najczęściej były to Gram-ujemne pałeczki produkujące β-laktamazy, głównie typu ESBL. Wśród badanych szczepów 32% stanowiły pałeczki *Klebsiella pneumoniae*, 28,74% pałeczki *E.coli*, 21,44% ziarenkowce *Enterococcus faecium* odporne na wankomycynę. Pozostałe gatunki izolowane były na poziomie nie przekraczającym 10% (Ryc. 2)



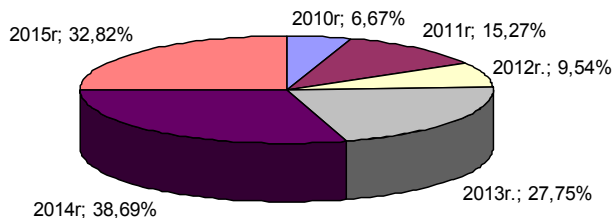
Ryc. 2. Procentowy udział poszczególnych wieloopornych bakterii w kolonizacji przewodu pokarmowego



* szczepy nie zredukowane

Ryc. 3 Zależność liczby wyhodowanych szczepów od liczby przysyłanych materiałów do badań.

Na rycinie 3 przedstawiono zależność liczby wyhodowanych szczepów od liczby przysyłanych materiałów do badań. Zgodnie z oczekiwaniem widać ścisłą korelację między liczbą wyhodowanych szczepów a liczbą przysyłanych materiałów.



Ryc. 4 Odsetek pacjentów skolonizowanych szczepami wieloopornymi w odniesieniu do wszystkich badanych pacjentów w tym okresie.

Tabela 1. Szczepy wielooporne wyhodowane w latach 2010 - 09.2015 od pacjentów hospitalizowanych w klinikach Centrum Onkologii.

DATA	2010 r.	2011 r.	2012 r.	2013r.	2014 r.	30.09.2015 r.	OGÓLEM
GATUNEK	liczba szczepów	liczba szczepów	liczba szczepów	liczba szczepów	liczba szczepów	liczba szczepów	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							
-ESBL	18	42	18	81	138	76	373
-KPC	0	1	0	0	0	0	1
-MBL	0	0	0	0	2	2	4
-NDM	0	0	0	0	0	3	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>							
-ESBL	0	3	2	3	6	2	16
-HL-AmpC	0	0	0	0	1	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>							
-ESBL	3	3	5	21	22	14	68
-DER	2	2	0	7	10	8	29
<i>E. coli</i>							
-ESBL	3	22	17	58	124	107	331
-E. coli HL-AmpC	1	3	0	2	6	0	12
<i>Citrobacter freundii</i>							
-ESBL	0	1	2	5	8	5	21
-DER	1	2	1	3	22	13	42
<i>Proteus mirabilis</i>							
-ESBL	0	1	0	0	2	4	7
-HL-AmpC	0	0	0	0	8	2	10
<i>Morganella morganii</i>							
-DER	0	0	0	1	1	0	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
-MBL	0	0	0	0	2	0	2
<i>Pseudomonas putida</i>							
-MBL	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. aureus</i> –MRS	3	4	4	3	5	0	19
<i>Enterococcus faecium</i>							
-VRE	7	7	15	37	115	70	251
<i>Enterococcus durans</i>							
-VRE	1	0	0	0	0	0	1
OGÓLEM	39	91	64	222	472	306	1194

Odsetek pacjentów skolonizowanych szczepami wieloopornymi przedstawiono na rycinie 4. Najmniejszy odsetek kolonizacji obserwowano w 2010 roku, czyli na początku okresu badanego, natomiast najwyższy w 2014 roku, co jest ściśle powiązane z liczbą przysyłanych badań oraz wprowadzeniem screeningu w kierunku VRE oraz w kierunku pałeczek wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym.

DYSKUSJA

Kolonizacja szczepami wieloopornymi, najczęściej związana jest z wielokrotnymi i długotrwałymi hospitalizacjami oraz stosowaniem szerokiego wachlarza antybiotyków (10, 17). Powszechnie znane są czynniki ryzyka kolonizacji szczepami VRE oraz wpływu terapii antybiotykowej na selekcję wieloopornych szczepów bakteryjnych. *Tyczkowska* i wsp. (17) w wykazali korelację między stosowaniem niewłaściwej i agresywnej antybiotykoterapii a występowaniem szczepów wieloopornych. *Mioljević* i wsp. (10) badając czynniki ryzyka kolonizacji szczepami VRE stwierdziła związek między stosowaniem antybiotyków i długotrwałą hospitalizacją, jaka ma miejsce w przypadku ostrej białaczki szpikowej a zwiększoną kolonizacją VRE. Ponieważ choroby nowotworowe wiążą się z licznymi hospitalizacjami i stosowaniem wielu antybiotyków, pacjenci Centrum Onkologii spełniają kryteria w/w badań.

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że wśród wyizolowanych wieloopornych szczepów dominują trzy gatunki drobnoustrojów kolonizujące przewód pokarmowy człowieka. Największy udział przypada pałeczkom z rodziny *Enterobacteriaceae* produkującym β -laktamazy (*K. pneumoniae* i *E. coli*) oraz ziarenkowcom *E. faecium* VRE. Podobne wyniki uzyskali *Wierzba* i wsp. (18) oraz *Paluchowska* i wsp. (14). W swoich badaniach nieco odmiennie wyniki uzyskali natomiast *Milner* i wsp. (11), w których najczęściej izolowano pałeczki *E. coli*.

W badaniach własnych zaobserwowano w ostatnich latach wzrost wyhodowań *E. faecium* VRE. Podobne obserwacje poczynili również *Matar* i wsp. (9). Wśród szczepów *Klebsiella* coraz częściej udaje się zidentyfikować NDM, KPC i MBL. Karbapenemaza KPC po raz pierwszy została wykryta u pałeczek *K. pneumoniae*, z tego względu nazwano ją *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (3,13,11,15).

Zaobserwowany w pracy spektakularny wzrost liczby izolowanych wieloopornych szczepów w roku 2014 związany jest zarówno z narastaniem oporności drobnoustrojów oraz wprowadzeniem do rutynowej diagnostyki tzw. screeningu tj. badań ukierunkowanych na zwiększenie detekcji szczepów wieloopornych. U hospitalizowanych pacjentów skolonizowany przewód pokarmowy, szczególnie szczepami wieloopornymi, może stanowić jedno ze źródeł poważnych zakażeń, stwarzających problemy terapeutyczne u pacjentów z obniżoną odpornością. Dlatego też ważne jest wykonywanie badań przesiewowych w tym kierunku, aby nie dopuszczać do rozprzestrzeniania się wieloopornych szczepów.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność monitorowania nosicielstwa wieloopornych szczepów wśród hospitalizowanych osób. Status mikrobiologiczny pacjenta pozwala na przewidywanie powikłań, a także jest podstawą wdrożenia odpowiedniego postępowania sanitarno-epidemiologicznego w celu zapobiegania rozprzestrzeniania się szczepów w środowisku szpitalnym.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bartoszko-Tyczkowska A, Gaszyński W, Tyczkowska-Sieroń E.* Analiza sytuacji epidemiologicznej oraz fenotypu oporności patogenów wyizolowanych od pacjentów Oddziału Intensywnej Terapii USK nr 1 w Łodzi w latach 2002-2006. *Med Dośw Mikrobiol* 2008; 60: 223-30.
2. *Dzierżanowska D.* Mechanizmy bakteryjnej oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Antybiotykoterapia praktyczna.* Wydawnictwo χ -medica Press 2001.
3. *Dzierżanowska D, Jelaszewicz J.* Zakażenia szpitalne. Zakażenia u pacjentów
4. po przeszczepie (z obniżoną odpornością). Wydawnictwo χ -medica Press; 1999: 256-275. Eksperckie zasady interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów- zalecenia Eucast wersja 2.0 25.11.2011.
5. *Holland T, Vance G, Fowler Jr, Samuel A, Shelburne III.* Invasive Gram-Positive Bacterial infection in Cancer Patients. Supplement Article 2014: 59: 331.
6. *Hryniewicz W.* Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywołanych przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Warszawa 2012.
7. *Kędzierska J, Węgrzyn J, Skotnicki A, Kędzierska A.* Terapeutyczne i epidemiologiczne aspekty infekcji opornymi na wankomycynę szczepami z rodzaju *Enterococcus* u chorych na schorzenia nowotworowe układu krwiotwórczego. *Acta Hematologica Polonica* 2003; 34: 187-99.
8. *Kicińska A, Lichodziejewska-Niemiecko M., Sledzińska A., Rutkowski B., Samet A.* Ocena częstości występowania drobnoustrojów izolowanych z krwi pacjentów hospitalizowanych w Szpitalu Klinicznym Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 2000-2002. *Przeł Epidemiol* 2007; 61: 465-75.
9. *Matar MJ, Tarrand J, Raad I, Rolston KV.* Colonization and infection with vancomycin resistant *Enterococcus* among patients with cancer. *Am J Infec Control* 2006, 34: 534-6.
10. *Miołjević V, Marković-Denić L, Vidović A.* Risk factors for vancomycin – resistant *Enterococcus* colonization in hematologic patients. *Vojnosanit Pregl* 2013; 70: 1109-16.
11. *Milner A, Bieńko D, Kamola R* i inni. Analiza częstości występowania i ocena lekowrażliwości szczepów *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 na oddziale chirurgii CSK WUM w okresie 1.01.2012-30.09.2014r. *Postępy Nauk Med* 2015; 28: 261-8.
12. *Nikonorow E, Baraniak A, Gniadkowski M.* Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post Mikrobiol* 2013, 52: 261-71.
13. *Noworyta J, Gago J, Ząbek J.* Istotne fenotypy oporności na antybiotyki, występujące wśród drobnoustrojów alarmowych, izolowanych z zakażeń diagnozowanych w Klinikach Instytutu Reumatologii w Warszawie. *Reumatologia* 2007; 45: 70-9.
14. *Paluchowska P, Skalkowska M., Spelak A, Budak A.* Występowanie patogenów alarmowych w środowisku szpitalnym. Część I. Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, wytwarzające β -laktamazy typu ESBL. *Med Dośw Mikrobiol* 2012, 64: 35-43.
15. *Piekarska K, Zacharczuk K, Szych J, Zawadzka E* i wsp. Występowanie w jednym z warszawskich szpitali pałeczek *Klebsiella pneumoniae*, wytwarzających karbapenemazy typu KPC. *Med Dośw Mikrobiol* 2010, 62: 2-90.
16. *Szczerba I, Gortat K, Majewski K.* Pałeczki z rodzaju *Klebsiella* izolowane od pacjentów łódzkich szpitali w 2006 r. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 41-6.
17. *Tyczkowska E, Bartoszek A, Gaszyński W.* Wpływ terapii antybiotykowej na selekcję wieloopornych szczepów bakteryjnych. *Med Dośw Mikrobiol* 2009; 61: 159-65.
18. *Wierzbza J, Rybak B, Bronk M, Samet A* i wsp. Nosicielstwo i zakażenia pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*, wytwarzającymi szeroko spektralne β -laktamazy ESBL u pacjentów oddziału niemowlęcego Kliniki Pediatrii, Hematologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Med. w latach 2002-2005. *Ann Acad Med Gedan* 2009; 39: 155-62.

Otrzymano: 14 X 2016 r.

Adres Autora: 02-781 Warszawa, ul. Roentgena 5, Zakład Mikrobiologii Klinicznej Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie Warszawa

Etiologia zakażeń towarzyszących nowotworowym zmianom narządów w obszarze głowy i szyi pacjentów hospitalizowanych w Centrum Onkologii w Warszawie w latach 2008-2012

Etiology of infection associated with neoplastic changes of organs in the head and neck in patients hospitalized in the Oncology Centre in Warsaw

Edyta Waker¹, Hanna Połowniak-Pracka¹, Romuald Krajewski², Marek Pietras², Agnieszka Woźniak¹, Katarzyna Hass¹, Agnieszka Magdziak¹, Maria Pawelec¹, Joanna Skrzeczyńska¹

Zakład Mikrobiologii Klinicznej
Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie Warszawa¹
Klinika Nowotworów Głowy i Szyi Centrum Onkologii
- Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Warszawa²

Retrospektywniej ocenie poddano wyniki posiewów 312 przedoperacyjnych wymazów pobranych ze zmian zapalnych towarzyszących pierwotnym zmianom nowotworowym pacjentów hospitalizowanych w Klinice Nowotworów Głowy i Szyi Centrum Onkologii w Warszawie w latach 2008-2012. Wśród wyhodowanych drobnoustrojów dominowały ziarniaki Gram-dodatnie, głównie metycylinowrażliwe szczepy *Staphylococcus aureus*. Ze zmian zapalnych często izolowano również pałeczki Gram-ujemne, należące przede wszystkim do rodziny *Enterobacteriaceae* oraz bakterie beztlenowe.

Słowa kluczowe: nowotwory głowy i szyi, kolonizacja/zakażenia, mikrobiota obszaru głowy i szyi

ABSTRACT

Introduction: According to clinical observations primary neoplastic lesions in the head and neck are often complicated by infection. The incidence of postoperative complications of cancer lesions of the head and neck, oral cavity, upper airways or larynx is from 19% up to 47% cases but in extensive and long-term operations can reach 80%.

Methods: We retrospectively evaluated results of microbiological investigations of 312 clinical specimens collected from patients from Clinical Head and Neck Cancers of Oncology Center in Warsaw in the years 2008 –2012. All samples of clinical materials were

plated on the suitable culture media and incubated according to the recommendations.

Results: The study has shown that from all collected clinical specimens 491 strains have been isolated. Nearly half of the cultured bacteria were Gram-positive cocci (48,7%), mainly methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. Most Gram-negative bacteria isolated from neoplastic lesions in the head and neck belong to *Enterobacteriaceae* (21%). 23,4% of cultured bacteria grown anaerobically and they were mainly Gram-negative rods.

Conclusions: The presence of diverse bacterial flora colonizing the mucous membranes of the mouth and throat may be the reason of difficulties in interpretation of microbiological investigation. It must be remembered that knowledge of colonizing and pathogenic flora of the area of head and neck enables appropriate preoperative prevention and empiric therapy.

Key words: head and neck cancer, contamination/infection, head and neck microbiota

WSTĘP

Pierwotna zmiana nowotworowa w obszarze głowy i szyi, jak potwierdzają obserwacje kliniczne, często powikłana jest zakażeniem bakteryjnym. Etiologia zakażeń towarzyszących zmianom nowotworowym przekłada się na etiologię zakażeń miejsca operowanego, które uznawane są za jedno z najczęściej występujących powikłań (4, 6, 7, 10). Zabiegom chirurgicznym związanych z nowotworami zlokalizowanymi w obrębie jamy ustnej, górnych dróg oddechowych czy krtani często towarzyszą powikłania bakteryjne (6). Częstość tych powikłań waha się od 19% aż do 47%, choć według niektórych autorów, przy rozległych operacjach prowadzonych w obrębie śluzówki jamy ustnej powikłania mogą występować nawet w 80% przypadków (9).

Tradycyjnie zabiegi w obrębie głowy i szyi uznawane są za zabiegi w „czystym zanieczyszczonym” (clean contaminated) polu operacyjnym. W zależności od umiejscowienia nowotworu i dojścia chirurgicznego częstość komplikacji występujących po operacjach w tym obszarze jest różna. Zakażenia ran pooperacyjnych zdarzają się wielokrotnie częściej w przypadku rozległych, długotrwałych operacji prowadzonych w obrębie błon śluzowych jamy ustnej i gardła, które w naturalny sposób bogate są w zróżnicowaną mikrobiotę.

Rozejście się rany, sepsa, zapalenie szpiku, czy przedłużona antybiotykoterapia to inne najczęściej występujące powikłania pooperacyjne, które znacznie wydłużają czas hospitalizacji pacjentów, jak również podnoszą koszty leczenia. Znajomość endogennej flory w obrębie planowanego miejsca operacyjnego oraz właściwa ocena flory bakteryjnej środowiska danego oddziału umożliwia trafne ustalenie zarówno profilaktyki okołoperacyjnej jak i terapii empirycznej. Do innych czynników obniżających ryzyko wystąpienia powikłań pooperacyjnych, obok właściwej techniki chirurgicznej, jest przyjmowanie pacjenta w dniu planowanego zabiegu, co zapobiega kolonizacji florą szpitalną (8, 9).

Celem pracy była mikrobiologiczna ocena przedoperacyjnych wymazów pobranych ze zmian zapalnych towarzyszących nowotworom narządów głowy i szyi u pacjentów hospitalizowanych w klinice Nowotworów Głowy i Szyi Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie w latach 2008 – 2012.

MATERIAŁ I METODY

Retrospektywnej ocenie poddano wyniki posiewów 312 próbek materiału klinicznego pobranego od pacjentów ze zmianami nowotworowymi w obrębie narządów głowy i szyi. hospitalizowanych w klinice Nowotworów Głowy i Szyi Centrum Onkologii w Warszawie w latach 2008-2012.

Hodowla. Próbkę materiału klinicznego posiewano na podłoża: Agar tryptozowo-sojowy z 5% krwi baraniej (TSSA), Chocolate Haemophilus agar (HAEM), agar z fioletem krystalicznym (AF), Mc Conkey'a (MC), Chapman'a (CH), Columbia z wit. K i 5% krwi baraniej (C) oraz podłoże płynne namnażające (BC).

Płytki z podłożem TSSA, HAEM i AF inkubowano w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂ przez 18-24 godz., natomiast płytki z podłożem MC, CH i BC inkubowano w temp. 37°C przez 18-24 godz. w warunkach tlenowych. Po pierwszym odczycie inkubację przedłużano o kolejne 24 godziny. Hodowle na podłożu Columbia agar z witaminą K i krwią baranią prowadzono w atmosferze wzbogaconej w CO₂ w temperaturze 37°C do 6 dni, przy czym pierwszy odczyt następował po 48 godzinach. Do wytworzenia atmosfery beztlenowej wykorzystywano saszetki GENbox anaer firmy bioMerieux. Po inkubacji płytki przeglądano oceniając jakościowo i ilościowo wzrost bakterii.

Identyfikacja. Po morfologicznej i mikroskopowej ocenie wyhodowanych kolonii, przeprowadzono identyfikację stosując komercyjne testy firmy bioMerieux SA:

ID 32 E, Rapid ID 32 E, ID 32 GN, API 20 E, API 20 NE, API NH, ID 32 Staph, API STAPH, Rapid ID 32 Streep, API 20 Strep, API Coryne, Rapid ID 32 A, API 20 A w systemie ATB oraz karty GN, GP i ANC w systemie VITEK 2 Compact.

W przypadku zakażeń gronkowcowych stosowano testy dodatkowe: „clumping factor” firmy bioMerieux, osocze królicze firmy Biomed do oznaczania koagulazy niezwiązanej oraz zdolność do wytwarzania DNA-zy.

WYNIKI

W latach 2008 – 2012 wyhodowano z próbek materiału klinicznego łącznie 491 szczepów bakterii rosnących w warunkach tlenowych i beztlenowych (Tabele I-IV). Blisko połowę (48,7%) wyhodowanych drobnoustrojów stanowiły ziarniaki Gram-dodatnie, spośród których 239 (35%) szczepów należało do gatunku *Staphylococcus aureus*. Odsetek szczepów metycylinoopornych w populacji *S. aureus* stanowił 2,4%. Większość pałeczek Gram-ujemnych izolowanych ze zmian zapalnych stanowiły drobnoustroje z rodziny *Enterobacteriaceae* – 103 szczepy (21%).

Drobnoustroje beztlenowe wykryto w 23,4% przypadków, z czego większość stanowiły Gram-ujemne pałeczki (57,4% wszystkich drobnoustrojów wyhodowanych w warunkach beztlenowych).

Tabela I. Drobnoustroje tlenowe Gram-dodatnie wyhodowane ze zmian zapalnych towarzyszących nowotworom w obrębie głowy i szyi (ogólna liczba izolatów 491)

DROBNOUSTRÓJ	LICZBA IZOLATÓW (%)
Ziarniaki Gram-dodatnie	239 (48,7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	169 (35)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2 (0,4)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7 (1,4)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4 (0,8)
<i>Staphylococcus simulans</i>	4 (0,8)
<i>Staphylococcus capitis</i>	2 (0,4)
<i>Staphylococcus hominis</i>	1 (0,2)
<i>Enterococcus faecalis</i>	23 (4,7)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (0,2)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	15 (3,1)
<i>Streptococcus haemolyticus</i> grupa C	5 (1,0)
<i>Streptococcus haemolyticus</i> grupa G	3 (0,6)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2 (0,4)
<i>Streptococcus anginosus</i>	1 (0,2)

Tabela II. Drobnoustroje tlenowe Gram-ujemne wyhodowane ze zmian zapalnych towarzyszących nowotworom w obrębie głowy i szyi (ogólna liczba izolatów 491)

DROBNOUSTRÓJ	LICZBA IZOLATÓW (%)
Pałeczki Gram-ujemne z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	103 (21)
<i>Enterobacter cloacae</i>	17 (3,5)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (0,2)
<i>Escherichia coli</i>	16 (3,3)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15 (3,0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (0,4)
<i>Klebsiella spp.</i>	1 (0,2)
<i>Raoultella planticola</i>	1 (0,2)
<i>Citrobacter koseri</i>	6 (1,2)
<i>Citrobacter freundii</i>	3 (0,6)
<i>Citrobacter braakii</i>	1 (0,2)
<i>Citrobacter spp.</i>	1 (0,2)
<i>Serratia marcescens</i>	2 (0,4)
<i>Serratia rubidaea</i>	1 (0,2)
<i>Hafnia alvei</i>	1 (0,2)
<i>Proteus mirabilis</i>	19 (3,9)
<i>Proteus vulgaris</i>	6 (1,2)
<i>Morganella morganii</i>	8 (1,6)
<i>Providencia rettgeri</i>	2 (0,4)
Pałeczki Gram-ujemne niefermentujące	32 (6,5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18 (3,7)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2 (0,4)

Cd. Tabeli II.

DROBNOUSTRÓJ	LICZBA IZOLATÓW (%)
<i>Pseudomonas putida</i>	1 (0,2)
<i>Pseudomonas spp.</i>	1 (0,2)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4 (0,8)
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	2 (0,4)
<i>Aeromonas sobria</i>	1 (0,2)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3 (0,6)
Inne pałeczki Gram-ujemne	1 (0,2)
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 (0,2)
Ziarniaki Gram-ujemne	1 (0,2)
<i>Moraxella catharalis</i>	1 (0,2)

Tabela III. Drobnoustroje beztlenowe Gram-dodatnie wyhodowane ze zmian zapalnych towarzyszących nowotworom w obrębie głowy i szyi (ogólna liczba izolatów 491).

DROBNOUSTRÓJ	LICZBA IZOLATÓW (%)
Ziarniaki Gram-dodatnie	31 (6,3)
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	8 (1,6)
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	8 (1,6)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	6 (1,2)
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	3 (0,6)
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	2 (0,4)
<i>Anaerococcus prevotii</i>	2 (0,4)
<i>Peptococcus spp.</i>	1 (0,2)
<i>Anaerococcus spp.</i>	1 (0,2)
Pałeczki Gram-dodatnie	8 (1,6)
<i>Propionibacterium acnes</i>	5 (1,0)
<i>Eggerthella lenta</i>	2 (0,4)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 (0,2)
Laseczki Gram-dodatnie	3 (0,6)
<i>Clostridium perfringens</i>	2 (0,4)
<i>Clostridium sp.</i>	1 (0,2)

Tabela IV. Drobnoustroje beztlenowe Gram-ujemne wyhodowane ze zmian zapalnych towarzyszących nowotworom w obrębie głowy i szyi (ogólna liczba izolatów 491).

DROBNOUSTRÓJ	LICZBA IZOLATÓW (%)
Pałeczki Gram-ujemne	66 (13,5)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7 (1,4)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3 (0,6)
<i>Fusobacterium sp.</i>	6 (1,2)
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	7 (1,4)
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2 (0,4)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3 (0,6)
<i>Bacteroides fragilis</i>	3 (0,6)

Cd. Tabeli IV.

DROBNOUSTRÓJ	LICZBA IZOLATÓW (%)
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1 (0,2)
<i>Bacteroides ovatus</i>	1 (0,2)
<i>Prevotella melaninogenica</i>	9 (1,9)
<i>Prevotella intermedia</i>	8 (1,6)
<i>Prevotella denticola</i>	5 (1,0)
<i>Prevotella sp.</i>	5 (1,0)
<i>Prevotella buccae</i>	2 (0,4)
<i>Prevotella loescheii</i>	2 (0,4)
<i>Prevotella bivia</i>	1 (0,2)
<i>Prevotella disiens</i>	1 (0,2)
Ziarniaki Gram-ujemne	7 (1,4)
<i>Veillonella spp.</i>	4 (0,8)
<i>Veillonella parvula</i>	3 (0,6)

DYSKUSJA

Zróznicowana flora kolonizująca błony śluzowe jamy ustnej i gardła często powoduje powikłania pooperacyjne w tym obszarze. Jest też przyczyną wyjątkowych trudności w interpretacji wyników badań mikrobiologicznych. Z tego powodu jest to bardzo trudny i rzadko poruszany problem.

W dostępnej literaturze istnieją jedynie nieliczne publikacje dotyczące zakażeń u pacjentów po zabiegach w obszarze głowy i szyi, chociaż problem czynników zwiększających ryzyko zakażeń szpitalnych, nie tylko u pacjentów z nowotworami w obrębie głowy i szyi, poruszany jest wielokrotnie (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9).

Jak wynika z zaprezentowanych danych, z patogennej flory miejsc operowanych najczęściej izolowane były metycylinowrażliwe szczepy *S. aureus*. Za florę typowo patogenną w zmianach zapalnych w obrębie narządów głowy i szyi z grupy bakterii Gram-dodatnich można uznać także *S. lugdunensis*, jak również paciorkowce beta-hemolizujące z tym, że szczepy *Streptococcus haemolyticus* grupy C i G mogą stanowić również florę kolonizującą górne drogi oddechowe.

Nasze obserwacje zgodne są z pojawiającymi się doniesieniami, w których autorzy wykazują, że w zakażeniach w obrębie głowy i szyi dominuje *Staphylococcus aureus* oraz gronkowce koagulazoujemne (2, 9). Jednak obecność w tym obszarze gronkowców koagulazoujemnych uznać można także za kontaminację. W przypadkach, w których stanowiły one florę dominującą traktowaliśmy je jako potencjalny czynnik mogący powodować zakażenia pooperacyjne, chociaż pozostaje to nadal sprawą dyskusyjną.

Podobnie jak w naszych badaniach, Candau-Alvarez i wsp. (2) z ran pooperacyjnych w obszarze głowy i szyi, oprócz gronkowca złocistego i gronkowców koagulazoujemnych, izolowali również *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter cloacae*. Drobnoustroje te izolowano zdecydowanie rzadziej niż gronkowce (ok. 4% wszystkich izolowanych drobnoustrojów). Na podobnym poziomie utrzymywała się także częstość izolacji innych pałeczek Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* czy *Proteus mirabilis*. Należy jednak pamiętać, że pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* w obszarze głowy i szyi stanowią typowe zakażenia oportunistyczne.

Spośród bakterii beztlenowych za florę zdecydowanie chorobotwórczą uznać można *Clostridium perfringens*. Wśród bakterii rosnących w warunkach beztlenowych izolowanych ze zmian zapalnych w obrębie narządów głowy i szyi dominowały pałeczki *Prevotella sp* oraz *Fusobacterium sp*, jednak stanowiąc one mogą zanieczyszczenie ran naturalną florą kolonizującą skórę i błony śluzowe górnych dróg oddechowych.

Problem zakażeń towarzyszących zmianom nowotworowym narządów w obszarze głowy i szyi jest bardzo złożony, trudny w interpretacji i wymaga dalszych wnikliwych obserwacji.

WNIOSKI

1. Najczęściej w zmianach nowotworowych powikłanych zakażeniem obserwuje się obecność flory naturalnie kolonizującej obszar narządów głowy i szyi pacjenta. W związku z czym określenie, czy wyhodowany drobnoustrój jest rzeczywistym czynnikiem zakażenia jest niezwykle trudne.
2. Określenie statusu mikrobiologicznego zmiany nowotworowej jest o tyle ważne, iż obraz ten przekłada się na etiologię zakażeń ran pooperacyjnych.
3. Znajomość flory stanowiącej naturalną mikrobiotę oraz flory typowo patogennej występującej w obszarze głowy i szyi w określonym polu operacyjnym umożliwia wdrożenie właściwej profilaktyki okołoperacyjnej, jest również podstawą zastosowania odpowiedniego leczenia empirycznego.

PIŚMIENNICTWO

1. *Benabdeslam A, Berrady MA, Khermaz M* i inni. Bacteriological profil of surgical site infection in orthopedic surgery about 142 cases. *International Journal of Scientific & Technology Research* 2014; 3: 271-7.
2. *Candau-Alvarez A, Linares-Sicilia MJ, Dean-Ferrer A, Perez-Navero JL*. Role of culture of postoperative drainage fluid in the prediction of infection of the surgical site after major oncological operations of the head and neck. *Brit J Oral Max Surg* 2015; 53: 200-3.
3. *Cunha TFS, Melania TAS, Ribeiro CMZF* i inni. Risk factors for surgical site infection in cervico-facial oncological surgery. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40: 443-8.
4. *Dzierżanowska D*. Zakażenia szpitalne. Wydawnictwo Alfa Medica Press. Wydanie 2. Bielsko-Biała 2008.
5. *Lee DH, Kim SY, Nam SY* i inni. Risk factors of surgical site infection In patients undergoing major oncological surgery for head and neck cancer. *Oral Oncol* 2011; 47: 528-31.
6. *Mazurek MJ, Rysz M, Jaworowski J* i inni. Contamination of surgical field in head and neck oncological surgery. *Head Neck* 2014; 10 : 1408-12.
7. *Meder J*. Podstawy Onkologii Klinicznej. Wydawnictwo Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego. Warszawa 2011.
8. *Montewka M, Skrzek A, Plewik D* i inni. Zakażenia miejsca operowanego – charakterystyka czynników ryzyka, endogennych źródeł zakażenia i metody zapobiegania. *Post Mikrobiol* 2012; 3: 227–35.
9. *Pietras M, Krajewski R, Połowniak-Pracka H*. Czy można wyeliminować zakażenia szpitalne w chirurgii nowotworów głowy i szyi? *Otolaryngologia Polska* 2005; 59: 1-5.
10. *Połowniak-Pracka H*. Zakażenia na oddziałach onkologicznych i chirurgii onkologicznej. *Zakażenia* 2003; 3:100-3.

Otrzymano: 16 IX 2016 r.

Adres Autora: 02-781 Warszawa, ul. Roentgena 5, Zakład Mikrobiologii Klinicznej Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie Warszawa

Wykorzystanie wybranych, rekombinowanych białek w serodiagnostyce zakażeń wywoływanych przez werotoksyczne pałeczki *Escherichia coli* (VTEC) u ludzi

Use of selected recombinant proteins in serodiagnosis of infections caused by verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in humans

Waldemar Rastawicki, Karolina Śmiateńska, Anna Chróst, Kornelia Gielarowicz, Tomasz Wolkowicz

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

Przeprowadzone badania wykazały, że uzyskane we własnym zakresie rekombinowane białka intymina, werotoksyna 2b i Tir pałeczek *E. coli* można wykorzystać jako swoiste antygeny w rutynowej serodiagnostyce zakażeń VTEC, przebiegających zwłaszcza jako zespół hemolityczno-mocznicowy. Najbardziej swoistym serologicznym markerem zakażenia pałeczkami VTEC jest obecność w surowicy osób chorych przeciwciał klasy IgG i/lub IgA dla rekombinowanego białka Tir.

Słowa kluczowe: VTEC, rekombinowane białka, intymina, werotoksyna, białko Tir, ELISA, zespół hemolityczno-mocznicowy

ABSTRACT

Introduction: Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) are a significant cause of haemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. Because VTEC isolates are usually present in patients' feces for only a limited period of time serodiagnosis based on the purified antigens have become the useful tool for laboratory diagnosis and monitoring of prevalence of VTEC infections. The aim of the present study was to evaluate the usefulness of in-house obtained recombinant proteins Tir, intymin and verocytotoxin 2b of *E. coli* as highly specific antigens in ELISA performed in the serodiagnosis of infections caused by VTEC in humans.

Materials and Methods: The study population, used for characterization of the humoral immune response to the recombinant proteins, consisted of 37 patients suspected for VTEC infection, mainly with clinical manifestation of HUS. Additionally serum samples from 78

clinically healthy persons and 96 patients with different bacterial infections (control group) were tested. Recombinant proteins were expressing in *E. coli* BL21 (DE3) using the pET-30 Ek/LIC expression vector (Novagen). Purification was accomplished by immobilized metal (Ni^{2+}) affinity column chromatography (His-trap).

Results: The antibodies against recombinant proteins were detected using the ELISA in about half of the tested patients suspected in clinical investigation for VTEC infection. Most of the antibodies belong to the IgG and IgA class of immunoglobulins. Statistical analysis of the results showed that the frequency of detecting antibodies among patients with HUS was significantly higher in relation to the clinically healthy persons. However, the percentage of positive results in the control group were also much higher than in healthy persons what may indicate for presence of non-specific reactions. The least non-specific response was detected by ELISA with the protein Tir as antigen.

Conclusions: The study showed that recombinant proteins Tir, intimin and verocytotoxin 2b of *E. coli* may be used as antigens in routine diagnosis of VTEC infections. The most specific antigen is a recombinant protein Tir.

Key words: *VTEC, recombinant proteins, intimin, verocytotoxin 2b, protein Tir, ELISA, HUS*

WSTĘP

Werotoksyczne pałeczki *E. coli* (VTEC) odpowiedzialne są za wywoływanie krwotocznego zapalenia okrężnicy, zespołu hemolityczno-mocznicowego (haemolytic ureamic syndrome - HUS), czy małopłytkowej plamicy zakrzepowej (thrombotic thrombocytopenic purpura – TTP). Pałeczki VTEC należą do różnych grup serologicznych, najczęściej do grupy O157, rzadziej do innych, umownie określanych mianem non – O157, takich jak: O26, O103, O111, O121, O145 czy O104. Do wywołania pełnych objawów zakażenia konieczne jest posiadanie przez te szczepy różnych czynników zjadliwości, w tym przede wszystkim werotoksyny I i/lub II, kodowanym na mobilnym elemencie genetycznym (fagu). Klasyczne, najczęściej izolowane szczepy VTEC powstają poprzez nabycie faga przez enteropatogenny szczep *E. coli* (EPEC), stąd najczęściej posiadają one takie dodatkowe mechanizmy wirulencji jak intymina, białko Tir, białko Esp czy hemolizyna (2, 7, 8, 9).

W poprzednich badaniach oceniono przydatność odczynu immunoenzymatycznego ELISA do poszukiwania przeciwciał dla lipopolisacharydów pałeczek VTEC u osób z zaburzeniami układu pokarmowego i zespołem hemolityczno-mocznicowym (14). Przeprowadzone uprzednio badania wykazały jednak ograniczoną przydatność LPS w rutynowych badaniach diagnostycznych ze względu na ich niską swoistość oraz fakt, że wykazanie u chorych osób obecności przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* z określonych serotypów nie świadczy bezpośrednio o zakażeniu szczepami werotoksycznymi. Tak więc, z powodu konieczności potwierdzania obecności charakterystycznych dla VTEC czynników zjadliwości, istniała potrzeba opracowania testu opartego na wybranych, wysoce swoistych rekombinowanych białkach werotoksycznych pałeczek *E. coli*.

Celem podjętych badań była ocena przydatności rekombinowanych białek Tir, werotoksyny 2b i intyminy w serodiagnostyce zakażeń wywoływanych przez werotoksyczne pałeczki *E. coli* u ludzi.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Do badań wykorzystano:

- 49 próbek surowicy uzyskanych od 37 osób z podejrzeniem zakażenia werotoksycznymi pałeczkami *E. coli*. U większości z tych osób doszło w przebiegu zakażenia do objawów zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS). Werotoksyczne pałeczki *E. coli* z grupy serologicznej O26 wyizolowano od 3 osób, z grupy O104 od 2 osób i z grupy O157 od jednej osoby.
- 96 próbek surowicy osób, z innymi niż werotoksyczne pałeczki *E. coli* zakażeniami przewodu pokarmowego. We wcześniej wykonywanych badaniach w próbkach tych wykazano wysoki poziom przeciwciał dla antygenów pałeczek *Yersinia*, *Salmonella* lub *Campylobacter*. Osoby te traktowano jako grupę kontrolną, służącą do określenia swoistości opracowanego zestawu ELISA.
- 78 próbek surowicy uzyskanych od klinicznie zdrowych osób

Uzyskiwanie rekombinowanych białek. W prezentowanej pracy postanowiono uzyskać trzy białka odgrywające istotną rolę w patogenezie zakażeń werotoksycznymi pałeczkami *E. coli*: białko Tir, fragment białka intyminy i werotoksynę 2b. Zaprojektowane we własnym zakresie startery służące do amplifikacji genów kodujących te białka oraz wielkość uzyskanych amplifikatów przedstawiono w tabeli I. Białka uzyskano metodami inżynierii genetycznej przy użyciu wektora pET30Ek/LIC firmy Novagen i oczyszczono metodą chromatografii metalopowinowactwa (IMAC) przy wykorzystaniu złoża Ni²⁺ - IDA (His – Bind Resing firmy Novagen).

Tabela I. Oligonukleotydy – startery genów kodujących białka: intyminę, werotoksynę 2b oraz Tir pałeczek *Escherichia coli*.

Gen	Białko	Starter	Sekwencja nukleotydów startera	Wielkość fragmentu
eae	Intymina (fragment)	eae-F	5'-GACGACGACAAG ATG CCGTCATATCCGGCATTAGG	846 bp
		eae-R	5'-GAGGAGAAGCCCGGT TTA AACCGCATAGACATTTGGAGT	
stx2B	Werotoksyna 2b	stx2B-F	5'-GACGACGACAAG ATGAAGAAGATGTTTATGGCGTT	270 bp
		stx2B-R	5'-GAGGAGAAGCCCGGT TCAGTCATTATTA AACTGCACTTC	
tir	Tir	tir-F	5'-GACGACGACAAG ATGCCTATTGGTAATCTTGGTCAT	1700 bp
		tir-R	5'-GAGGAGAAGCCCGGT TTAGACGAAACGATGGGATCCCGG	

Odczyn immunoenzymatyczny ELISA. W badaniach wykorzystano odczyn ELISA wymiarczkowany we własnym zakresie. Test ELISA przeprowadzono na metapleksowych płytkach firmy Nunc zgodnie z metodyką opisaną w poprzednich publikacjach, oznaczając poziom przeciwciał klasy IgA, IgG oraz IgM (9, 13, 15). Jako antygeny wy-

korzystano rekombinowane białko Tir, intyminę i werotoksynę 2b a także antygeny LPS uzyskane poprzednio (14). W badaniach zastosowano koniugaty firmy Dako (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/IgG/IgM/HRP).

Statystyczne opracowanie wyników. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Instat (Instat Biostatic). Istotność różnic w częstości wykrywania przeciwciał w próbkach surowicy osób należących do różnych grup oceniano testem niezależności chi-kwadrat z zastosowaniem poprawki Yatesa. Za znamienne statystycznie przyjęto różnice, gdzie poziomy istotności p były mniejsze od 0,05 ($p < 0,05$).

WYNIKI

W tabeli II przedstawiono liczbę i odsetek osób podejrzanych o zakażenie pałeczkami VTEC (z objawami HUS), osób klinicznie zdrowych oraz osób z grupy kontrolnej, u których wykryto na diagnostycznie znamiennej poziomie przeciwciała dla LPS pałeczek *E. coli* z wybranych grup serologicznych oraz rekombinowanych białek: Tir, werotoksyny 2b oraz intyminy.

Tabela II. Liczba i odsetek (%) osób z zespołem hemolityczno-mocznicowym (HUS) oraz osób z grup kontrolnych, u których wykryto przeciwciała w diagnostycznie znamiennej poziomie dla LPS pałeczek *E. coli* z wybranych grup serologicznych oraz rekombinowanych białek: TIR, werotoksyny STX-2b oraz intyminy.

Grupa badanych osób	Liczba osób	Antygen zastosowany w odczynie ELISA:											
		LPS			TIR			werotoksyna 2b			intymina		
		IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Osoby z zespołem HUS	37	22 (59,5)	23 (62,2)	20 (54,1)	12 (32,4)	17 (45,9)	3 (8,1)	14 (37,8)	14 (37,8)	3 (8,1)	12 (32,4)	18 (48,6)	2 (5,4)
Osoby klinicznie zdrowe	78	11 (14,1)	13 (16,7)	6 (7,7)	5 (6,4)	2 (2,6)	nb	3 (3,8)	7 (9,0)	nb	7 (9,0)	8 (10,3)	nb
Osoby z różnymi zakażeniami bakteryjnymi	96	26 (27,1)	54 (56,3)	18 (18,8)	11 (11,5)	7 (7,3)	nb	18 (18,8)	22 (22,9)	nb	22 (22,9)	17 (17,7)	nb

nb = nie badano

Przeciwciała dla LPS pałeczek *E. coli* stwierdzano statystycznie istotnie częściej ($p < 0,001$) u osób z HUS (w ponad 60% przypadków) niż u osób klinicznie zdrowych. Co istotne, przeciwciała te wykryto na diagnostycznie znamiennej poziomie u wszystkich osób, u których zakażenie pałeczkami VTEC potwierdzono izolacją drobnoustroju z próbek kału. Niestety, badania prowadzone na próbkach uzyskanych od osób z grupy kontrolnej wykazały, że przeciwciała klasy IgG dla antygenów LPS występowały aż w 56,3% przypadków. Tak wysoki odsetek wyników dodatnich może świadczyć o niskiej swoistości LPS i występowaniu nieswoistych reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami skierowanymi dla antygenów pałeczek *Yersinia*, *Salmonella* czy *Campylobacter* a uzyskanymi

z pałeczek *E. coli* lipopolisacharydami. Z tego względu w bieżących badaniach skupiono się na wynikach odczynu ELISA, w którym zastosowano jako antygeny rekombinowane białko Tir, werotoksynę 2b i intyminę.

Podobnie jak w przypadku LPS, przeciwciała dla wszystkich trzech rekombinowanych białek stwierdzano statystycznie istotnie częściej u osób z HUS niż u osób klinicznie zdrowych. Na uwagę zasługuje jednak bardzo niski odsetek wyników dodatnich w przypadku poszukiwania przeciwciał klasy IgM u osób z HUS. Z tego powodu u klinicznie zdrowych osób oraz osób z grupy kontrolnej nie oznaczano przeciwciał w tej klasie immunoglobulin. U osób z grupy kontrolnej, zgodnie z oczekiwaniem, przeciwciała dla rekombinowanych białek wykrywano rzadziej niż przeciwciała dla LPS. Nie mniej jednak, przeciwciała klasy IgG dla werotoksyny 2b wykryto u 22,9%, a dla intyminy u 17,7% osób z grupy kontrolnej. Najmniej nieswoistych reakcji podczas badania osób z grupy kontrolnej (7,3% przypadków) uzyskano przy poszukiwaniu przeciwciał klasy IgG dla rekombinowanego białka Tir (Tabela II).

DYSKUSJA

Według dotychczas przyjętych kryteriów, laboratoryjne potwierdzenie zakażenia wywołanego przez pałeczki VTEC można uzyskać na podstawie izolacji szczepu *E. coli* wytwarzającego werotoksynę, wykrycia obecności genów kodujących werotoksynę bądź też wykrycia wolnych werotoksyn. W wielu krajach, prowadzone są jednakże badania dotyczące wykorzystania wyników badań serologicznych do potwierdzenia zakażenia wywołanego przez te drobnoustroje (1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 14, 15). Jest to o tyle istotne, że pałeczki VTEC ze względu na bardzo krótki okres przebywania w układzie pokarmowym (kilka dni), morfologicznego podobieństwa do innych niechorobotwórczych pałeczek *E. coli* i częstej utraty genu kodującego werotoksynę w wyniku pasażowania, są trudne do izolacji w warunkach rutynowo prowadzonej diagnostyki bakteriologicznej. Dodatkowo, wyniki badań serologicznych mogą być wykorzystane w retrospektywnych badaniach dotyczących rozpowszechnienia zakażeń wywołanych przez pałeczki VTEC w populacji.

Przydatność antygenów lipopolisacharydowych w serodiagnostyce zakażeń wywołanych przez werotoksyczne pałeczki *E. coli* omówiono szeroko w poprzednich publikacjach (5, 6, 11, 12, 14). Zarówno w badaniach własnych jak i innych autorów podkreślano ograniczoną swoistość LPS jako antygenów. W dostępnym piśmiennictwie opisywano występowanie krzyżowych reakcji pomiędzy przeciwciałami swoistymi dla LPS *E. coli* O157 a antygenami takich bakterii jak *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Vibrio cholerae* O1 Inaba, pałeczek *Salmonella* grupy N oraz *Citrobacter freundii* czy *Escherichia hermanni* (1, 13). Trzeba mieć na uwadze, że wykazanie podwyższonego poziomu przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* należących do określonych grup serologicznych nie musi świadczyć o zakażeniu szczepami zdolnymi do produkcji werotoksyn czy też innych czynników chorobotwórczych. Z tego względu istniała konieczność opracowania odczynu serologicznego opartego na charakterystycznych dla VTEC rekombinowanych białkach. W badaniach prowadzonych przez innych autorów stosowano jako swoiste antygeny intyminę, białko Tir, białka sekrecyjne (EspA i EspB) czy też werotoksynę. Według Li i wsp. (11) oraz Jenkins i wsp. (9) najbardziej obiecujące w serodiagnostyce VTEC jest zastosowanie jako swoistych antygenów białka Tir oraz intyminy. W aktualnie prezentowanej

pracy oceniono przydatność zaprojektowanych i uzyskanych we własnym zakresie rekombinowanych białek: Tir, werotoksyny 2b i intyminy w serodiagnostyce zakażeń wywołanych przez werotoksyczne pałeczki *E. coli* u ludzi.

W grupie osób z HUS najczęściej wykrywano przeciwciała klasy IgG dla intyminy oraz białka Tir, nieco rzadziej dla werotoksyny 2b. Na uwagę zasługuje bardzo niski odsetek próbek surowicy, w których wykryto przeciwciała klasy IgM dla rekombinowanych białek. Z tego względu nie można wykorzystać uzyskanych preparatów antygenowych do poszukiwania przeciwciał w tej klasie immunoglobulin. W przypadku zastosowania jako antygenów rekombinowanych białek zaobserwowano znacznie mniej nieswoistych reakcji podczas badania próbek osób z grupy kontrolnej niż przy użyciu LPS. Najbardziej swoistym antygenem wydaje się być rekombinowane białko Tir, przy użyciu którego uzyskano najmniej nieswoistych krzyżowych reakcji, zwłaszcza w klasie IgG.

W badanej grupie osób z HUS znalazły się trzy osoby, u których doszło do zakażenia werotoksycznymi pałeczkami *E. coli* z grupy serologicznej O104 (16). U osób tych, pomimo wykazania obecności wysokiego poziomu przeciwciał dla homologicznych antygenów LPS nie stwierdzono przeciwciał dla rekombinowanych białek Tir, werotoksyny 2b i intyminy. Trzeba mieć jednakże na uwadze, że szczep ten nie należał do klasycznych VTEC, lecz był szczepem enteroagregacyjnym, który nabył werotoksynę typu 2a i nie posiadał białka Tir oraz intyminy (8).

Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność poszukiwania przeciwciał dla werotoksycznych pałeczek *E. coli* w rutynowych badaniach diagnostycznych. Trzeba mieć jednakże na uwadze ograniczoną czułość testów opartych na rekombinowanych antygenach oraz możliwość występowania nieswoistych reakcji dodatnich. W następnym etapie badań planuje się wykorzystanie uzyskanych antygenów do retrospektywnego poszukiwania swoistych przeciwciał u osób z różnych grup populacji polskiej.

WNIOSKI

1. Rekombinowane białka Tir, intymina i werotoksyna 2b pałeczek *E. coli* można wykorzystać w rutynowej serodiagnostyce zakażeń VTEC, przebiegających jako zespół hemolityczno-mocznicowy. Trzeba mieć jednakże na uwadze ograniczoną czułość testów opartych na tych antygenach oraz możliwość występowania nieswoistych reakcji dodatnich.
2. Wykazanie u chorych osób obecności przeciwciał dla LPS pałeczek *E. coli* z określonych serotypów nie świadczy bezpośrednio o zakażeniu szczepami werotoksycznymi. Z tego powodu oraz ze względu na niską swoistość tych antygenów, wyniki badań serologicznych z użyciem antygenów LPS muszą być potwierdzane innymi, bardziej swoistymi badaniami.
3. Najbardziej swoistym serologicznym markerem zakażenia klasycznymi pałeczkami VTEC jest wykazanie w surowicy osób chorych obecności przeciwciał klasy IgG i/lub IgA dla rekombinowanego białka Tir.

Praca wykonana w ramach tematu naukowego nr 4/EM.1 na rok 2016, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

PIŚMIENNICTWO

1. Chart H, Jenkins C. The serodiagnosis of infections caused by verocytotoxin – producing *Escherichia coli*. J App Microbiol 1999; 86: 731-40.
2. Chart H, Cheasty T. Human infections with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 – 10 years of *E. coli* O157 serodiagnosis. J Med Microbiol 2008; 57: 1389-93.
3. Chart H, Perry NT, Cheasty T, Wright PA. The kinetics of antibody production to antigens of *Escherichia coli* O157 in a pregnant woman with haemolytic uraemic syndrome. J Med Microbiol 2002; 51: 522-5.
4. Chart H, Scotland SM, Rowe B. Serum Antibodies to *Escherichia coli* Serotype O157:H7 in Patients with Hemolytic Uremic Syndrome. J Clin Microbiol 1989, 27: 285-90.
5. Evans J, Chalmers R.M., Chart H. Evidence of persisting serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide and Verocytotoxin in members of rural communities in England. Europ J Epidemiol 2000; 16: 885-9.
6. Greatorex JS, Thorne GM. Humoral Immune Responses to Shiga-Like Toxins and *Escherichia coli* O157 Lipopolysaccharide in Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Healthy Subjects. J Clin Microbiol 1994; 32: 1172-8.
7. Januszkiewicz A, Podsiadły E, Szych J i inni. Charakterystyka fenotypowych i genotypowych właściwości werotoksycznego szczepu *E. coli* O111 wyizolowanego od pacjenta z zespołem hemolityczno – mocznicowym. Med Dośw Mikrobiol 2010; 62: 319-30.
8. Januszkiewicz A, Chróst A, Wołkiewicz T i inni. Ognisko wywołane przez anteroagregacyjny i werotoksyczny szczep *Escherichia coli* O104:H4 w Europie – postępowanie diagnostyczne w Polsce oraz charakterystyka szczepu. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 287-98.
9. Jenkins C, Chart H, Smith HR i inni. Antibody response of patients infected with Verocytotoxin producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the LEE locus. J Med Microbiol 2000; 49: 97-101.
10. Leszczyńska B, Ziółkowska H, Podsiadły E i inni. Diagnostic Value of Serological Tests Against Verotoxigenic *Escherichia coli* in Hemolytic Uremic Syndrome in Children. Adv Clin Exp Med 2015, 24, 6, 1031-6.
11. Li Y, Frey E, Mackenzie A i inni. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infect Immun 2000; 68: 5090-5.
12. Ludwig K, Bitzan M, Bobrowski C, Muller-Wiefel DE. *Escherichia coli* O157 Fails to Induce a Long-Lasting Lipopolysaccharide-Specific, Measurable Humoral Immune Response in Children with Hemolytic-Uremic Syndrome. J Infect Dis 2002; 186: 566-9.
13. Navarro A, Eslava C, Hernandez U i inni. Antibody Responses to *Escherichia coli* O157 and Other Lipopolysaccharides in Healthy Children and Adults. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:797-801.
14. Rastawicki W, Rokosz N. Ocena przydatności odczynu immunoenzymatycznego ELISA do poszukiwania przeciwciał dla lipopolisacharydów enterokrwotocznych pałeczek *Escherichia coli* (EHEC) u osób z zaburzeniami układu pokarmowego i zespołem hemolityczno-mocznicowym. Med Dośw Mikrobiol 2014; 66: 161-75.
15. Reymond D, Johnson RP, Karmali MA i inni. Neutralizing antibodies to *Escherichia coli* Vero cytotoxin 1 and antibodies to O157 lipopolysaccharide in healthy farm family members and urban residents. J Clin Microbiol 1996; 34:2053-7.

16. Rokosz N, Rastawicki W, Jagielski M. Wykorzystanie odczynu ELISA do poszukiwania przeciwciał dla lipopolisacharydów werotoksycznych pałeczek okrężnicy u osób podejrzanych o zakażenie szczepem *Escherichia coli* O104:H4 w Polsce. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 299-304.

Otrzymano: 19 IX 2016 r.

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

Genotypowanie szczepów *Clostridium perfringens* izolowanych od chorych z objawami zatrucia pokarmowego oraz próbek żywności

Genotyping *Clostridium perfringens* strains isolated from patients with symptoms of food poisoning and food samples

Klaudia Brodzik, Ewa Augustynowicz

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Szczepy *Clostridium perfringens* często wywołują zatrucia pokarmowe o charakterze ognisk epidemicznych lub epidemii, dlatego też ważne jest opracowanie oraz zaadaptowanie skutecznych metod genotypowania przydatnych w dochodzeniach epidemiologicznych. Molekularną charakterystykę pilotażowej grupy izolatów *C. perfringens*, łączonych z zatruciami pokarmowymi, przeprowadzono z użyciem metod RAPD, rep-PCR oraz PFGE. Potwierdzono wysokie zróżnicowanie niepowiązanych epidemiologicznie szczepów *C. perfringens* izolowanych od chorych z objawami zatrucia pokarmowego oraz próbek żywności.

Słowa kluczowe: *Clostridium perfringens*, genotypowanie, PFGE, rep-PCR, RAPD

ABSTRACT

Introduction: *Clostridium perfringens* strains that produce enterotoxin often cause outbreaks of food poisoning or epidemic, therefore is essential to develop and adapt methods useful in epidemiological investigations. The aim of the study was to assess the genetic diversity of *C. perfringens* strains isolated from patients with symptoms of food poisoning and food samples.

Methods: In this study it has been determined the genetic diversity of the pilot group of epidemiologically non- related 39 *C. perfringens* strains using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), rep-PCR (Repetitive DNA Element Based PCR) and PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) methods.

Results and Conclusions: It has been obtained comparable results of differentiation of *C. perfringens* strains isolated from patients with symptoms of food poisoning and food

samples using RAPD and rep-PCR methods. It has been also confirmed a wide genetic diversity among *C. perfringens* strains isolated from different sources epidemiologically non – related using PFGE.

Key words: *Clostridium perfringens*, genotyping, PFGE, rep-PCR, RAPD

WSTĘP

Clostridium perfringens to Gram-dodatnie, beztlenowe laseczki tworzące przetrwalniki, które wchodzą w skład mikroflory przewodu pokarmowego człowieka i zwierząt oraz powszechnie występują w środowisku, w tym głównie w glebie, zbiornikach wodnych i ścięgach (17). Chorobotwórczość *C. perfringens* związana jest z wytwarzaniem określonego profilu toksyn, których dotychczas opisano 17 (11, 18). Poszczególne szczepy wytwarzają tylko niektóre z nich. Ze względu na obecność genów kodujących 4 główne toksyny letalne alfa (α), beta (β), epsilon (ϵ) oraz iota (ι), szczepy *C. perfringens* można podzielić na 5 toksynotypów (A-E) (16). Ważnym czynnikiem zjadliwości jest również enterotoksyna CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) wytwarzana w większości przez szczepy typu A oraz toksyna CPB2 wytwarzana przez szczepy typu A i C (16). Pozostałe toksyny i enzymy hydrolytyczne, wytwarzane przez *C. perfringens* mają także znaczenie chorobotwórcze (5). Szczepy *C. perfringens* CPE+ mogą wywoływać zatrucia i zakażenia pokarmowe o charakterze lokalnych ognisk epidemicznych, jak również zakażenia układu pokarmowego, które nie są związane ze spożyciem skażonej żywności tj.: biegunki poantybiotykowe (AAD - antibiotic associated diarrhoea), biegunki sporadyczne (SD - sporadic diarrhoea) i zespół nagłego zgonu niemowlęcia (SIDS- sudden infant death syndrome) (11).

Po zjedzeniu niewłaściwie termicznie obrabionej żywności zanieczyszczonej *C. perfringens* CPE+, bakterie przedostają się do jelita cienkiego, dochodzi do sporulacji i wytwarzania enterotoksyny, której aktywność powoduje uszkodzenie błony śluzowej jelita, co prowadzi do biegunki. Zatrucia pokarmowe o etiologii *C. perfringens* należą do jednych z najczęstszych chorób przenoszonych przez skażoną żywność na świecie (11). Przykładowo w latach 1998-2010 w Stanach Zjednoczonych odnotowano 289 ognisk epidemicznych i 15 208 przypadków zatruc pokarmowych o etiologii *C. perfringens*, które doprowadziły do hospitalizacji 83 pacjentów i 8 zgonów (6). W Polsce, w porównaniu z innymi rozwiniętymi krajami, rejestrowano od kilku do kilkudziesięciu przypadków zatruc pokarmowych o etiologii *C. perfringens* (3). W 2015 roku zarejestrowano 109 przypadków zachorowań, z których większość została poddana hospitalizacji (15). Ze względu na ograniczenia w diagnostyce *C. perfringens* można podejrzewać, że są to dane niedoszacowane. Badania genetycznej zmienności izolatów *C. perfringens* pomagają ocenić relacje pomiędzy szczepami patogennymi i niepatogennymi oraz zdefiniować determinanty chorobotwórczości (9, 17, 18).

Celem pracy było określenie zróżnicowania genetycznego niepowiązanych epidemiologicznie szczepów *C. perfringens* izolowanych od chorych z objawami zatrucia pokarmowego oraz próbek żywności przy użyciu metod genotypowania takich jak RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) i rep-PCR (Repetitive DNA Element Based PCR) opartych na amplifikacji DNA oraz PFGE polegającej na analizie restrykcyjnej genomowego DNA (Pulsed Field Gel Electrophoresis).

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Łącznie w badaniach wykorzystano 39 izolatów niezwiązanych epidemiologicznie zaliczonych do gatunku *C. perfringens* metodą MALDI-TOF (Tabela I) (1). Szczepy te zgromadzono w latach 1947-1987 i stanowią część archiwalnej kolekcji

Tabela I. Charakterystyka badanych szczepów *C. perfringens*.

Lp.	Numer izolatu	Pochodzenie szczepu	Źródło izolacji (rozpoznanie)	Rok izolacji	Obecność genu <i>cpe</i>
1	344	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1952	+
2	416	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1983	+
3	417	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Kraków	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1953	-
4	431	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Wrocław	Treść pokarmowa (zatrucie pokarmowe)	1953	-
5	543	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Wrocław	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1954	-
6	645	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1955	-
7	859	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Wycinek tkanki (zgorzel gazowa)	1956	-
8	954	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Wycinek tkanki (zgorzel gazowa)	1978	-
9	955	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Treść pokarmowa (zatrucie pokarmowe)	1956	+
10	1001	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1957	-
11	1025	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Wrocław	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1958	-
12	1037	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Katowice	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1959	-
13	1270	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1987	-
14	1116	Well Research Laboratory Norwegia	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1963	+
15	1121	Well Research Laboratory, Norwegia	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1963	-
16	80	Instytut Pasteura, Paryż	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1946	-

Cd. Tabeli I.

Lp.	Numer izolatu	Pochodzenie szczepu	Źródło izolacji (rozpoznanie)	Rok izolacji	Obecność genu <i>epe</i>
17	233	Instytut Pasteura, Paryż	bd (zatrucie pokarmowe)	1951	-
18	626	Instytut Pasteura, Paryż	bd (zatrucie pokarmowe)	1952	-
19	629	Instytut Ceutanzino, Londyn	bd (zatrucie pokarmowe)	1955	-
20	1172	Instytut Wielka Brytania	bd (zatrucie pokarmowe)	1980	-
21	1126	Well Research Laboratory, Niemcy	bd (zatrucie pokarmowe)	1963	-
22	267	Instytut Eksperymentalny, Moskwa	bd (zatrucie pokarmowe)	1951	-
23	211	Instytut Alabama, USA	bd (zatrucie pokarmowe)	1951	-
24	150	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
25	151	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
26	286	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
27	384	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
28	478	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
29	512	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
30	526	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
31	545	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	1983	-
32	547	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
33	597	nz	Próbka kału (zatrucie pokarmowe)	nz	-
34	926	nz	Próbka żywności (zatrucie pokarmowe)	1976	-
35	927	nz	bd (zatrucie pokarmowe)	1976	-
36	928	nz	bd (zatrucie pokarmowe)	1976	+
37	958	nz	Treść pokarmowa (zatrucie pokarmowe)	1956	-
38	1266	nz	bd (zatrucie pokarmowe)	nz	+
39	ATCC CN3352	Instytut Pasteura, Paryż	szczep referencyjny	nz	-

bd- brak danych

Zakładu Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny. Badaniom poddano 30 szczepów wyizolowanych z próbek klinicznych, pobranych od chorych z objawami zatrucia pokarmowego (w tym 6 szczepów CPE+), 7 szczepów wyizolowanych z próbek żywności oraz 2 szczepy wyizolowane z próbek pobranych od chorych z objawami zgorzeli gazowej użyte do celów porównawczych. Jako szczep kontrolny *C. perfringens* typu A wykorzystano CN3352 *cpe*-. Szczepy przechowywano w postaci liofilizatów.

Hodowla szczepów *C. perfringens*. Liofilizaty ożywiano na podłożu TSA (Tryptone Soja Agar) lub TSA z krwią baranią (Grasco). Inkubacje prowadzono w warunkach beztlenowych (95% H₂, 5% CO₂), w temp. 37°C przez 48-72 godz.

Izolacja genomowego DNA. Genomowe DNA izolowano z 48-godzinnych hodowli bakterii na podłożu TSA z zastosowaniem komercyjnego zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie oraz stopień czystości wyizolowanego DNA określono metodą spektrofotometryczną (BioPhotometer, Eppendorf). Za kryterium czystości przyjęto stosunek długości fali 260 nm/280 nm o wartości mieszczącej się w granicach 1,8-2,0.

Genotypowanie metodą RAPD. Genotypowanie RAPD wykonano przy użyciu startera 1254 i 1290, zgodnie z procedurą opisaną przez Williams i wsp. (1990) z modyfikacjami własnymi. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 25 ng genomowego DNA, 200 μM dNTP, 2 mM MgCl₂, 40 pmol startera, 2 U polimerazy Dream Taq (Fermentas) oraz 1 × bufor do polimerazy (Fermentas). Warunki amplifikacji obejmowały: wstępną denaturację w 94°C/3 min oraz 42 cykle złożone z denaturacji w 94°C/1 min, przyłączania startera w 36°C/1 min, wydłużania nici w 72°C/1 min.

Genotypowanie metodą rep-PCR. Genotypowanie metodą rep-PCR wykonano przy użyciu startera BOXA1-R oraz (GTG)₅, zgodnie z procedurą opisaną przez Coudeyras i wsp. (2008). Mieszanina reakcyjna zawierała: 25 ng genomowego DNA, 200 μM dNTP, 60 pmol startera, 1 U polimerazy Dream Taq (Fermentas) oraz 1 × bufor do polimerazy (Fermentas). Warunki amplifikacji obejmowały: wstępną denaturację w 94°C/5 min oraz 35 cykli złożonych z denaturacji w 94°C/30 s, przyłączania startera w 50°C/1 min, wydłużania nici w 72°C/4 min.

Genotypowanie metodą PFGE. Genotypowanie metodą PFGE wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez Maslanka i wsp. (1999) z modyfikacjami własnymi. Po 24-godzinnej inkubacji na podłożu TSA kolonie bakterii zawieszano w buforze SE (75 mM NaCl-25 mM EDTA, pH 8,0) do uzyskania wartości 8,0 w skali McFarland'a. Przygotowaną zawiesinę łączono w równej objętości z wcześniej rozpuszczoną 1% agarozą niskotopliwą (Low-Melting-Point agarose, Bio-Rad), po czym przenoszono do prostopadłościennych foremek oraz inkubowano przez 20 min na lodzie. Zestalone bloczki umieszczano w 400 μl buforu TE (10 mM Tris-1 mM EDTA, pH 8,0) i poddawano działaniu lizozymu (100 μl) w temp. 37°C przez 2 godz. Po inkubacji bloczki płukano 4-krotnie w buforze TE po 15 min w temp. 55°C i poddawano lizie w 300 μl buforu lizującego (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0) z dodatkiem proteinazy K (2 mg/ml) przez noc w temp. 55°C. Następnie bloczki płukano 5-krotnie w buforze TE oraz jednokrotnie w buforze restrykcyjnym NEB4 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DPT) po 15 min w temp. 50°C. Badane DNA poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *Apa*I oraz *Sma*I (po 40 U, BioLabs Inc.) przez 16 godz. w 25°C. Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym w aparacie CHEF DR III (Bio-Rad) przez 20 godz., przy zastosowaniu następujących warunków: temp. 14°C, bufor

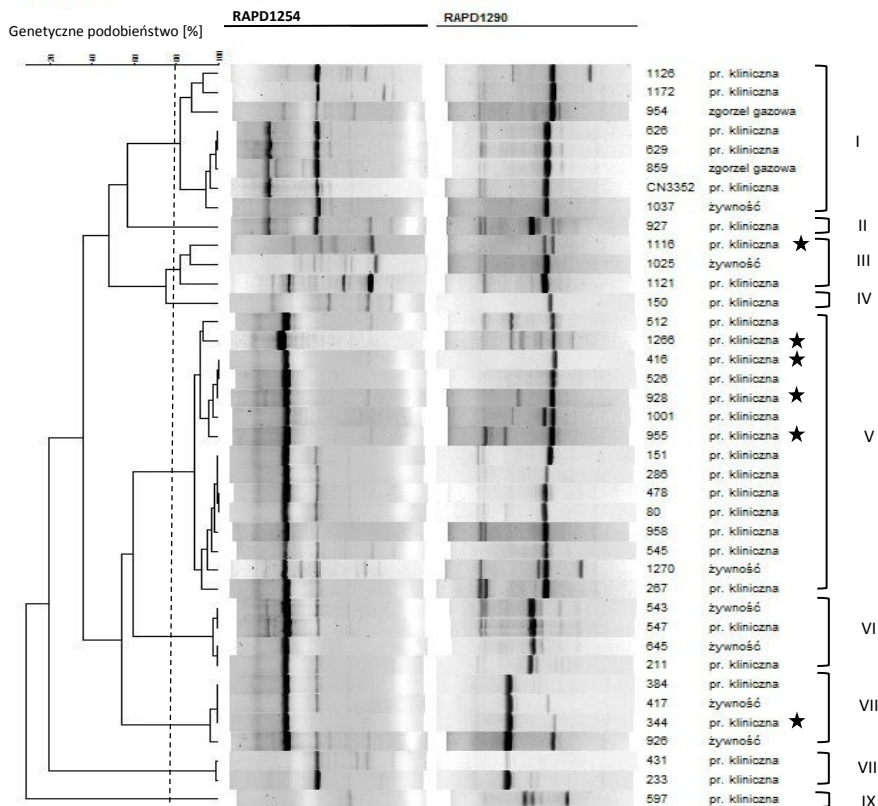
0,5 × TBE (45 mM Tris, 45 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,3, Bio-Rad), napięcie 6 V/cm, długość pulsów od 0,5 do 40 s. Zastosowano marker wielkości Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs Inc.). Żel wybarwiono bromkiem etydy (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) przez 30 min. Wynik rozdziału elektroforetycznego dokumentowano za pomocą Gel Doc 1000 Gel Documentation System (Bio-Rad). Wewnętrzną kontrolę dodatnią stanowił szczep referencyjny *C. perfringens* ATCC CN3352 (American Type Culture Collection).

Analiza wyników genotypowania. W rozdzielach elektroforetycznych stosowano markery wielkości: w badaniu RAPD oraz rep-PCR - Marker Perfect 100 bp DNA Ladder (EURx), w badaniu PFGE - Lambda Ladder PFG Marker (BioLabs Inc.). Wyniki genotypowania zostały poddane analizie z użyciem oprogramowania BioNumerics (Applied Maths) z zastosowaniem metody klasteryzacji UPGMA i współczynnika korelacji Pearson'a (w przypadku wyników uzyskanych metodą RAPD i rep-PCR) lub Dice'a (w przypadku wyników uzyskanych metodą PFGE). W każdej z metod profile genotypowania uzyskane z zastosowaniem różnych układów starterów/enzymów restrykcyjnych poddano jednoczesnej analizie z użyciem funkcji „composite data set”. Stopień zróżnicowania analizowanych izolatów (Sr) obliczono jako stosunek liczby wyróżnionych typów (na poziomie odcięcia 80%) do liczby analizowanych szczepów.

WYNIKI

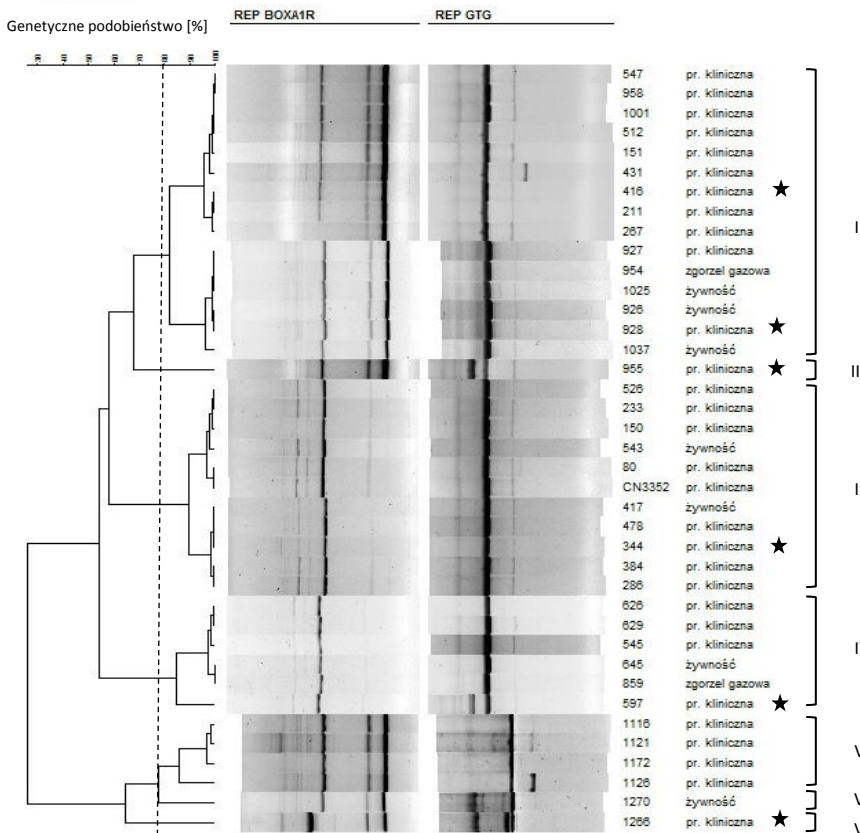
Genotypowanie *C. perfringens* metodą RAPD. Zastosowanie startera 1254 w badaniu RAPD pozwoliło uzyskać profile elektroforetyczne zawierające 1-7 prążków o wielkości od 160 do powyżej 2500 pz. Genetyczne podobieństwo badanych szczepów *C. perfringens* wynosiło 0,7%. Wyróżniono 9 profili RAPD. Stopień zróżnicowania badanych izolatów (Sr) wynosił 23%. Zastosowanie startera 1290 w badaniu RAPD pozwoliło uzyskać profile elektroforetyczne zawierające 1-6 prążków o wielkości od 220 do powyżej 2500 pz. Genetyczne podobieństwo badanych szczepów *C. perfringens* wynosiło 6,2%. Wyróżniono 4 profile RAPD. Stopień zróżnicowania izolatów (Sr) wynosił 10,3%. Jednoczesna analiza profili pozwoliła uzyskać 9 profili oznakowanych od I do IX (Ryc.1). Najliczniejsza grupa V obejmowała 15 szczepów *C. perfringens*, w tym 4 szczepy CPE+, grupa I, VI, VII obejmowały odpowiednio 8, 4 i 4 szczepy, do pozostałych grup przyporządkowano 1-2 szczepy. Szczepy CPE+ były zlokalizowane w oddzielnym grupach.

Genotypowanie *C. perfringens* metodą rep-PCR. Zastosowanie startera BOXA1-R w badaniu rep-PCR pozwoliło uzyskać profile elektroforetyczne zawierające 2-11 prążków o wielkości od 260 do powyżej 2500 pz. Genetyczne podobieństwo badanych szczepów *C. perfringens* wynosiło 11,7%. Wyróżniono 6 profili RAPD. Stopień zróżnicowania izolatów (Sr) wynosił 15,4%. Zastosowanie startera (GTG)₅ w badaniu rep-PCR pozwoliło uzyskać profile elektroforetyczne zawierające 1-3 prążków o wielkości od 600 do powyżej 2500 pz. Genetyczne podobieństwo badanych szczepów *C. perfringens* wynosiło 1,8%. Wyróżniono 5 profili RAPD. Stopień zróżnicowania izolatów (Sr) wynosił 12,8%. Jednoczesna analiza profili rep-PCR uzyskanych z zastosowanie starterów BOXA1-R oraz (GTG)₅ pozwoliła uzyskać 7 profili oznakowanych od I do VII (Ryc.2). Grupy I, III, IV, V obejmowały odpowiednio 15, 11 (w tym szczep kontrolny) 6 i 4 szczepy. Do grup, II, VI, VII przyporządkowano po 1 szczepie. Szczepy CPE+ były zlokalizowane w oddzielnym grupach (II, III, IV, VII) poza grupą I która obejmowała dwa szczepy CPE+.



Ryc. 1. Dendrogram przedstawiający genetyczne podobieństwo szczepów *C. perfringens* metodą RAPD przy użyciu startera 1254 oraz startera 1290 utworzony z zastosowaniem funkcji „composite data set”. Gwiazdkami oznaczono szczepy CPE+.

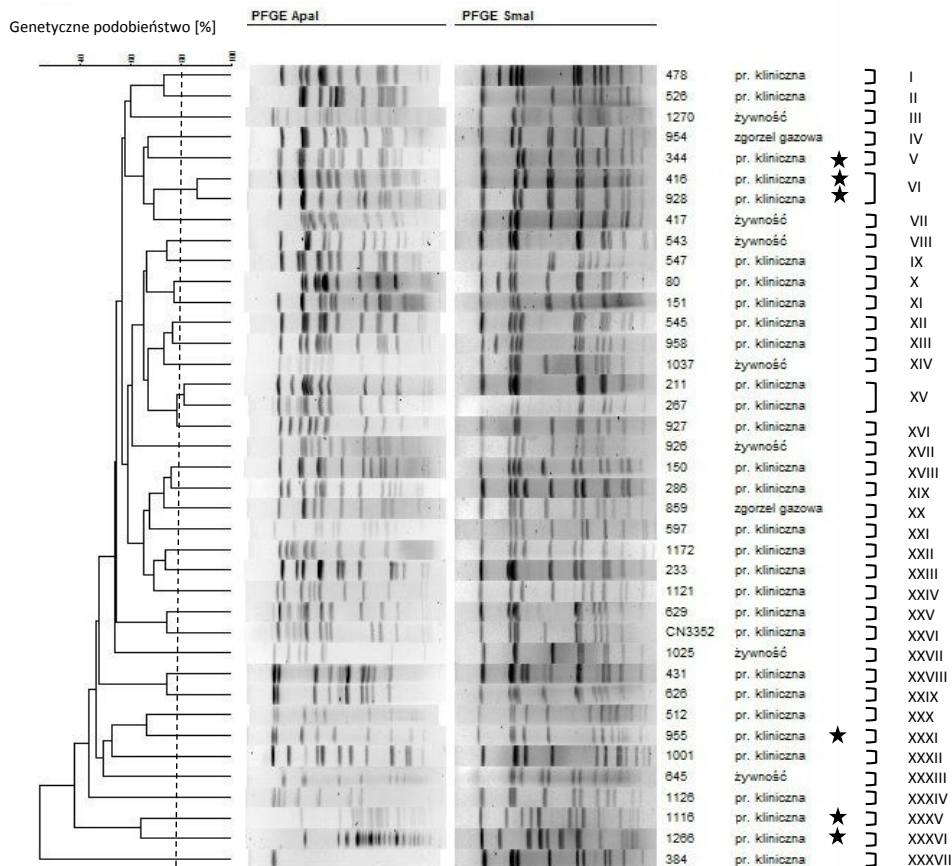
Genotypowanie *C. perfringens* metodą PFGE. Zastosowanie endonukleazy restrykcyjnej *Sma*I w badaniu PFGE pozwoliło uzyskać profile elektroforetyczne złożone z 7-15 prążków o wielkości od poniżej 48,5 kpz do 533,5 kpz. Genetyczne podobieństwo badanych szczepów *C. perfringens* wynosiło 28,9%. Wyróżniono 37 profili RAPD. Stopień zróżnicowania izolatów (Sr) wynosił 94,9%. Zastosowanie endonukleazy restrykcyjnej *Apa*I w badaniu PFGE pozwoliło uzyskać profile elektroforetyczne złożone z 1- 18 prążków o wielkości od poniżej 48,5 kpz do 533,5 kpz. Genetyczne podobieństwo badanych szczepów *C. perfringens* wynosiło 9,4%. Wyróżniono 20 profili PFGE. Stopień zróżnicowania izolatów (Sr) wynosił 51,3%. Jednoczesna analiza profili PFGE uzyskanych z zastosowaniem endonukleazy restrykcyjnej *Sma*I oraz *Apa*I pozwoliła uzyskać znacznie większą liczbę profili PFGE (37 profili oznakowanych od I do XXXVII, wśród których 35 profili reprezentowało pojedyncze szczepy) (Ryc.3). Szczepy CPE+ były zlokalizowane w oddzielnym grupach.



Ryc. 2. Dendrogram przedstawiający genetyczne podobieństwo szczepów *C. perfringens* metodą rep-PCR przy użyciu startera BOXA1-R oraz (GTG), utworzony z zastosowaniem funkcji „composite data set”. Gwiazdkami oznaczono szczepy CPE+.

DYSKUSJA

Szczepy *C. perfringens* wytwarzające enterotoksynę (CPE) często wywołują zatrucia pokarmowe o charakterze ognisk epidemicznych lub epidemii, ale wiedza dotycząca ich rezerwuaru i dróg transmisji jest wciąż niepełna. Wynika to w znacznej mierze stąd, że szczepy *C. perfringens* są szeroko rozpowszechnione w środowisku, a jedynie 1-5% populacji szczepów *C. perfringens* posiada gen *cpe* (5, 7). Dodatkowe trudności stanowi odmienna lokalizacja genu *cpe* wśród szczepów wywołujących zatrucia pokarmowe (lokalizacja na chromosomie), a szczepami będącymi przyczyną AAD i SD (lokalizacja na plazmidach) (18). We wcześniejszej pracy wśród 39 badanych szczepów *C. perfringens* u 6 potwierdzono obecność genu *cpe*, co stanowiło 15,4% wszystkich badanych izolatów oraz 27,3% izolatów łączonych z zatruciami pokarmowymi (1) i jest zbliżone do wyników *Lukinmaa* i wsp. (2002), gdzie zidentyfikowano aż 65,9% szczepów CPE+ izolowanych z próbek klinicznych, związanych z lokalnymi epidemiami zatrucia pokarmowego. Szczepy *C. perfringens* CPE+ stanowią wysoce zróżnicowaną genetycznie grupę, co potwierdziły badania *Keto-Timonen* i wsp. (2006).



Ryc. 3. Dendrogram przedstawiający genetyczne podobieństwo szczepów *C. perfringens* metodą PFGE przy użyciu enzymu *Apal* oraz *SmaI* utworzony z zastosowaniem funkcji „composite data set”. Gwiazdkami oznaczono szczepy CPE+.

Jednocześnie w badaniach zespołów *Keto-Timonen* i wsp. (2006) oraz *Deguchi* i wsp. (2009) potwierdzono, że szczepy CPE+ izolowane na przestrzeni 60 lat w różnych częściach świata, u których gen *cpe* zlokalizowany był na chromosomie, wykazują wysoką homogenność. Odmienne szczepy *C. perfringens* z genem *cpe* zlokalizowanym na plazmidzie reprezentują wysoki poziom zróżnicowania porównywalny ze szczepami CPE-.

Przedstawiono wyniki genetycznego różnicowania grupy niepowiązanych ze sobą epidemiologicznie szczepów *C. perfringens*, pozyskanych w różnych latach w odległych geograficznie miejscach z próbek klinicznych od pacjentów z objawami zakażeń przewodu pokarmowego oraz próbek żywności. Do analizy wybrano dwie proste do przeprowadzenia w laboratorium metody, oparte na amplifikacji DNA (RAPD i rep-PCR) oraz metodę PFGE, która jest bardziej wymagająca metodycznie, ale wciąż uznawana jako metoda z wyboru w dochodzenia epidemiologicznych i określaniu genetycznego podobieństwa szczepów *C. perfringens* w laboratoriach, gdzie nie mogą być przeprowadzone badania oparte na sekwencjonowaniu (12, 13). Zastosowanie do genotypowania metodą RAPD kil-

ku różnych starterów oraz optymalizacja warunków reakcji, w celu usunięcia możliwych ograniczeń związanych z niskim poziomem jej powtarzalności, pozwoliła uzyskać zadowalający poziom powtarzalności oraz siły różnicującej przy użyciu startera 1254 (14, 21). Podobnie metoda rep-PCR pozwalająca wykrywać wysoce konserwowane, powtarzalne w genomie sekwencje DNA, występujące w liczbie kilkuset kopii, cechuje się wysoką siłą dyskryminującą, przy czym jest stosunkowo prostą i szybką w wykonaniu (19, 20). Otrzymano porównywalne wyniki różnicowania szczepów *C. perfringens* typu A z zastosowaniem metody RAPD i rep-PCR. Z kolei kompleksowa analiza profili restrykcyjnych otrzymanych metodą PFGE po zastosowaniu endonukleaz *SmaI* oraz *ApaI* pozwoliła uzyskać dobrze zróżnicowany obraz profili, prawie w całości niepowtarzalnych. Szczepy CPE+ były zlokalizowane w oddzielnym grupach PFGE. Nie stwierdzono związku między miejscem pochodzenia, źródłem izolacji ani rokiem izolacji, co można wytłumaczyć tym, że analizie poddano szczepy niepowiązane ze sobą epidemiologicznie, wyizolowane w różnych latach i w odległych geograficznie miejscach. Wcześniej przydatność metody PFGE w dochodzeniach epidemiologicznych zatruc pokarmowych potwierdzono w badaniach Maslanka i wsp. (1999), gdzie typowano 62 izolaty *C. perfringens* typu A, pochodzące z różnych ognisk zatruc pokarmowych. Przydatność tej metody do różnicowania szczepów *C. perfringens* podkreślał również Lukinmaa i wsp. (2002), wskazując jednocześnie na to, że istotne jest określenie obecności w genomie genu *cpe*, jako stwierdzenie przynależności do określonego genotypu. Wcześniej potwierdzono przydatność metody PFGE (*SmaI*) do różnicowania szczepów epidemicznych. Opublikowano wyniki nielicznych badań genetycznego podobieństwa metodą PFGE wśród szczepów epidemicznych oraz pojedyncze prace, w których potwierdzono wysokie zróżnicowanie wśród szczepów niezwiązanych epidemiologicznie (7). Podobnie w badaniach Lin i Labbe (2003) u 40 niezwiązanych epidemiologicznie szczepów uzyskano różne profile PFGE (*ApaI*), gdzie na poziomie odcięcia 80% jedynie dwa szczepy reprezentowały wysokie podobieństwo. Uzyskane w pracy wyniki genotypowania PFGE z edonukleazami *SmaI* oraz *ApaI* potwierdziły wysokie zróżnicowanie szczepów *C. perfringens* niepowiązanych epidemiologicznie, izolowanych od chorych z objawami zatrucia pokarmowego oraz próbek żywności.

PIŚMIENNICTWO

1. Brodzik K, Augustynowicz E, Korzeniowska-Kowal A, Lutyńska A. Zastosowanie metody MALDI-TOF do identyfikacji szczepów *Clostridium perfringens*. Med Dośw Mikrobiol 2016; 68: 13-21.
2. Coudeyras S, Marchandin H, Fajon C, Forestier C. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* Group. Appl Environ Microbiol 2008; 9: 2679-89.
3. Czarkowski MP, Cielebak E, Kondej B, Staszewska E. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2013 roku. Biuletyn roczny 2013: 23.
4. Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T i inni. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. PLoS One 2009; 4: 5598.
5. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics and translational applications. Toxins 2016; 73: 1-16.
6. Grass EJ, Gould HL, Mahon EB. Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. Foodborne Pathog Dis 2013; 10: 131-6.

7. Johansson A, Aspan A, Bagge E i inni. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. BMC Microbiol 2006; 31: 47.
8. Keto-Timonen R, Heikinheimo A, Eerola E, Korkeala H. Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2006; 44: 4057-65.
9. Lacey JA, Johannesen PA, Lyras D, Moore RJ. Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *Clostridium perfringens*: a review. Avian Pathol 2016; 45: 302-7.
10. Lin YT, Labbe R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1642-6.
11. Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel Insights into the Epidemiology of *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning. Food Microbiol 2011; 28: 192-8.
12. Lukinmaa S, Takkunen E, Siitonen A. Molecular Epidemiology of *Clostridium perfringens* Related to Food-Borne Outbreaks of Disease in Finland from 1984 to 1999. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 3744-9.
13. Maslanka SE, Kerr JG, Williams G i inni. Molecular Subtyping of *Clostridium perfringens* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Facilitate Food-Borne-Disease Outbreak Investigations. J Clin Microbiol 1999; 37: 2209-14.
14. McClelland M., Welsh J. DNA fingerprinting by arbitrarily Primed PCR. PCR Meth Applic 1994; 4: 4-12.
15. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH, Departament Zapobiegania oraz Zwalczania Zakażeń i Chorób Zakaźnych u Ludzi GIS. Dwutygodniowa 12/B/15; 1.01-31.12.
16. Miyamoto K, Jihong L, McClane BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Detection and Identification. Microbes Environ 2012; 27: 343-9.
17. Myers GSA, Rasko DA, Cheung JK i inni. Skewed Genomic Variability in Strains of the Toxigenic Bacterial Pathogen, *Clostridium perfringens*. Genome Res 2006; 16: 1031-40.
18. Park M, Deck J, Foley SL i inni. Diversity of *Clostridium perfringens* isolates from various sources and prevalence of conjugative plasmids. Anaerobe 2016; 38: 25-35.
19. Siragusa GR, Danyluk MD, Hiatt KL i inni. Molecular Subtyping of Poultry-Associated Type A *Clostridium perfringens* Isolates by Repetitive-Element PCR. J Clin Microbiol 2006; 44: 1065-73.
20. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Methods Cell Biol 1994; 5: 25-40.
21. Williams J, Hanafey M, Rafalski J, Tigney A. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Meth Enzymol 1993; 218: 704-40.

Otrzymano: 19 IX 2016 r.

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

Częstość wykrywania rozpuszczalnych antygenów *Candida* sp.
i *Aspergillus* sp. metodami serologicznymi w płynach ustrojowych
pacjentów Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie

Frequency of detection of soluble antigens of *Candida* spp.
and *Aspergillus* spp. using serological assays in body fluids of patients
of Central Clinical Hospital in Warsaw

Sylwia Jarzynka^{1,2}, Maciej Przybylski^{2,3}, Agata Sulowska², Marlena Gołaś^{2,3},
Tomasz Dzieciatkowski^{2,3}, Marta Wróblewska^{2,4}

Zakład Biologii Medycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny¹
Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny² WUM
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny³
Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny⁴

W przypadkach zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego o różnorodnym podłożu, znacząco wzrasta ryzyko zakażeń patogenami oportunistycznymi, w tym infekcji grzybiczych. Podstawową metodą wykrycia zakażenia grzybiczego jest monitorowanie serologiczne, pozwalające na szybkie wdrożenie leczenia przeciwgrzybiczego. Celem pracy było określenie częstości wykrywania rozpuszczalnych antygenów grzybów z rodzajów *Candida* sp. i *Aspergillus* sp. przy użyciu metod immunoenzymatycznych w próbkach materiału klinicznego, pobranych od pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie w latach 2010-2015 oraz określenie grup chorych, szczególnie narażonych na inwazyjne zakażenia grzybicze.

Słowa kluczowe: grzybyce inwazyjne, mannan, galaktomannan, antygeny rozpuszczalne, metody immunoenzymatyczne

ABSTRACT

Introduction: Immunodeficient patients, e.g. transplant recipients, patients treated with corticosteroids, people with AIDS and individuals undergoing prolonged antibiotic therapy are at high risk of invasive fungal infections, especially invasive aspergillosis. Basic

method for detection of organ/systemic fungal infection is serological monitoring in body fluids, first of all in serum, but also in broncho-alveolar lavages (BALF). Proven invasive fungal infection should be diagnosed by culture of the pathogen or histopathological examination of infected tissues, however the detection of soluble fungal antigens in body fluids gives enough information for diagnosis of probable fungal infections, according to European Organization for Research and Treatment of Cancer recommendations, what allows introduction of antifungal therapy. Aim of the study was to assess the frequency of detection of circulating soluble fungal antigens with use of immunoenzymatic techniques in patients hospitalized between 2010 and 2015 in Independent Public Central Clinical Hospital (IPCCH) in Warsaw.

Methods: In IPCCH, between 2010 and 2015, 6475 serum samples, taken from 2096 patients, was tested for *Candida* spp. mannan antigen, and 7745 sera from 2243 patients were tested for galactomannan antigen of *Aspergillus* spp, as well as 64 samples of BALF. Material was collected mainly from haematopoietic stem cell transplant recipients, hospitalized in Haematology and Oncology Clinics, during their routine post-transplant monitoring. Testing was performed with use of quantitative (*Candida* antigen) or semiquantitative (*Aspergillus* antigen) immunoenzymatic methods (BioRad-Platelia), according to respective protocols.

Results: During examined period, increase in number of examinations was observed; starting from 1311 tests performed in 2010, up to 3052 examinations in 2015. In 2015 testing for *Aspergillus* antigen in BALF samples was also introduced, resulting in 64 samples tested. *Candida* spp. antigen was detected in 171 samples (2,7% of all tested samples), and *Aspergillus* galactomannan was detected in 645 serum samples (8,4%) and 8 BALF samples (12,5%). Majority of examinations was performed for patients hospitalized in Haematology and Oncology Clinics (72,7%), Blood Vessel Surgery and Transplantology Clinics (3,8%), as well as in patients under care of post-transplantation (8,3%) and haematology (4,2%) out-patient clinics.

Conclusions: (i) In the 2010-2015 visible increase in number of fungal antigens examinations was observed, (ii) significant number of examinations was performed in onco-haematological patients (88,7%), what also indicates main risk group, (iii) 8,3% of fungal antigen testing was performed in solid organ transplant recipients, the second risk group for invasive fungal infection.

Key words: invasive fungal infections, mannan, galactomannan, soluble antigens, immunoenzymatic methods

WSTĘP

W przypadkach zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego znacząco wzrasta ryzyko zakażeń patogenami oportunistycznymi, w tym infekcji grzybiczych. Dotyczy to przede wszystkim pacjentów, u których stosuje się terapię kortykosteroidami lub innymi lekami immunosupresyjnymi, pacjentów z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego, osób poddanych zabiegom przeszczepienia komórek krwiotwórczych i narządów unaczynionych, chorych na AIDS, a także przypadków stosowania długotrwałej an-

tybiotykoterapii. Główne zagrożenie stanowi zakażenie grzybami pleśniowymi, objawiające się przede wszystkim jako inwazyjna postać aspergillozy (*IA – invasive aspergillosis*). Inwazyjne zakażenia grzybami drożdżopodobnymi są natomiast notowane znacznie rzadziej. Podstawową metodą wykrycia zakażenia grzybiczego jest systematyczne monitorowanie metodami serologicznymi, polegające na wykrywaniu rozpuszczalnych antygenów *Aspergillus* spp. i *Candida* spp. w kolejnych próbkach surowicy krwi, a także wykrywanie antygenów *Aspergillus* spp w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych. W wielu wypadkach badania te pozwalają na szybkie wdrożenie leczenia przeciwgrzybiczego. Zgodnie z wytycznymi EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group) z 2002 i 2008 r., testy serologiczne wykrywające antygeny grzybicze, stanowią jeden z parametrów umożliwiających rozpoznanie grzybicy inwazyjnej (2, 3). Ma to szczególne znaczenie u onkohematologicznych pacjentów, u których oznaczanie miana przeciwciał swoistych wobec grzybów chorobotwórczych nie jest miarodajne ze względu na liczne wyniki fałszywie ujemne (4). Należy jednak podkreślić, że izolacja i hodowla *in vitro* patogenów jest nadal uważana za „złoty standard”. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi EORTC/IFI (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections), podstawowym kryterium mikrobiologicznym umożliwiającym zdefiniowanie pewnej (ang. *proven*) grzybicy inwazyjnej pozostaje wyizolowanie czynnika etiologicznego z materiału w warunkach fizjologicznych jałowego lub histopatologiczne potwierdzenie infiltracji tkanek strukturami komórkowymi grzybów (2, 5). Jednakże w wielu przypadkach, pomimo klinicznego podejrzenia grzybicy, próby izolacji czynnika etiologicznego kończą się niepowodzeniem, a w preparacie mikroskopowym nie udaje się zaobserwować elementów morfologicznych grzybów (pseudostrzępek, strzępek) (6). Z kolei, metody diagnostyczne polegające na wykrywaniu beta-D-glukanu mogą wykazywać reakcje krzyżowe, natomiast użycie metod molekularnych wiąże się z jednej strony z trudnościami w izolacji kwasów nukleinowych ze struktur komórkowych grzybów, z drugiej zaś, może prowadzić do wykrycia materiału genetycznego grzybów kontaminujących próbkę. Stąd też notowane są wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne, trudne w interpretacji (8, 9). W konkluzji, często oznacza to, że ostatecznego rozpoznania grzybicy inwazyjnej dokonuje się w badaniach *post-mortem*.

Wykrycie krążących antygenów i określenie ich miana (metody ilościowe) lub indeksu (metody półilościowe) przy użyciu metod serologicznych jest wystarczające do stwierdzenia i monitorowania toczącego się prawdopodobnego (ang. *probable*) zakażenia grzybiczego. Pozwala to na śledzenie samego procesu rozwoju grzybicy inwazyjnej, a także skuteczności zastosowanej terapii (10). Na uwagę zasługuje fakt, że stosowane obecnie testy serologiczne traktują rozpuszczalne oligosacharydy ściany komórkowej konkretnych gatunków grzybów jako antygenowe markery zakażenia. Według doniesień literaturowych, podczas infekcji inwazyjnej utrzymują się one w krwiobiegu tylko przez pewien czas (od 8 do 96 godz.), ulegając nieustannej eliminacji w wyniku wiązania się ze swoistymi przeciwciałami w niewykrywalne metodami serologicznymi kompleksy immunologiczne (2). Z tego też powodu, u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka zalecane jest regularne monitorowanie obecności rozpuszczalnych antygenów grzybów w płynach ustrojowych chorych (surowicy krwi, osoczu lub popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych) (11). Wykrycie antygenów krążących, poprzedzające izolację patogenu z materiału, może dotyczyć nawet 60% osób z podejrzeniem zakażenia inwazyjnego (7)

Celem pracy było określenie częstości wykrywania rozpuszczalnych antygenów grzybów z rodzajów *Candida* spp. i *Aspergillus* spp. przy użyciu immunoenzymatycznych metod w materiałach klinicznych, pobranych od pacjentów Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie w latach 2010-2015 oraz określenie grup chorych, szczególnie narażonych na inwazyjne zakażenia grzybicze.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom serologicznym poddano 14222 próbek pobranych od 4339 pacjentów hospitalizowanych w SP CSK w Warszawie. W 6475 próbkach pochodzących od 2096 pacjentów poszukiwano antygenów *Candida* sp. Badania na obecność antygenów *Aspergillus* sp. wykonano w przypadku 7747 próbek materiału klinicznego, pobranych od 2243 pacjentów. Materiał do badań w 99,9% stanowiły próbki surowicy krwi, jedynie 0,05% stanowiły próbki płuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych (BALF). Materiał, pochodzący od chorych z Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, poddanych zabiegowi przeszczepienia allogenicznych komórek krwiotwórczych (HSCT), pobierano dwukrotnie w ciągu tygodnia w ramach monitorowania zakażeń potransplantacyjnych, zgodnie z aktualnymi zaleceniami European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT) (11). Probki pochodzące od chorych z innych klinik SP CSK pobierano jednorazowo lub wielokrotnie przy klinicznych wskazaniach podejrzenia inwazyjnego zakażenia grzybiczego.

Ilościowym testem Platelia *Candida* Ag monitorowano stężenie [pg/ml] antygeny mannanowego w surowicy przy zastosowaniu monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciwko α -1,5 oligomannozydom *Candida* spp (potocznie: mannan). Wykrycie mannanu na poziomie ≥ 125 pg/ml w próbkach surowicy interpretowano jako wynik dodatni na obecność antygeny *Candida* spp. Półilościowym testem Platelia *Aspergillus* Ag wykrywano rozpuszczalną formę antygeny galaktomannanowego (surowica i płuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe). Metodę oparto na reakcji antygeny z przeciwciałem monoklonalnym EBA-2. Probki surowicy i BALF z indeksem $\geq 0,5$ interpretowano jako dodatnie na obecność antygeny *Aspergillus* spp. Obecność antygenów grzybiczych oznaczano w 300 μ l materiału klinicznego przy użyciu zestawów immunoenzymatycznych (EIA/ELISA) Platelia *Candida* Ag Plus oraz Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad). Procedura wykonania testów oraz interpretacji wyników odpowiadała ściśle zaleceniom producenta.

WYNIKI

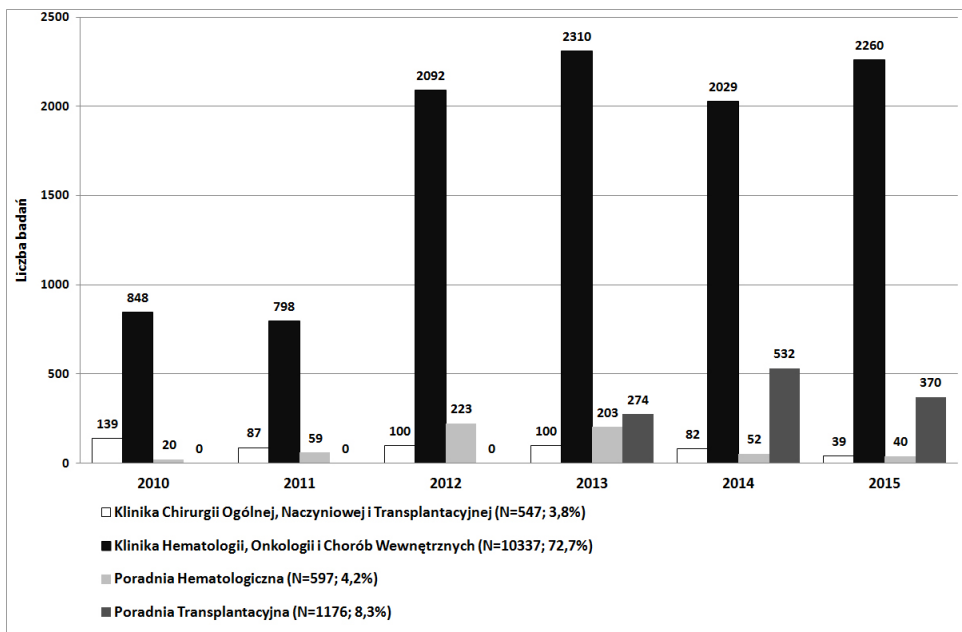
W badanym okresie zaobserwowano systematyczny wzrost liczby badań wykonywanych w kierunku obecności antygenów grzybiczych, poczynając od 1311 badań w 2010 r. do 3052 badań wykonanych w 2015 r. (Tab.I). W 2015 w Zakładzie Mikrobiologii SP CSK rozpoczęto wykrywanie galaktomannanu *Aspergillus* sp. także w próbkach płuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych. Ogółem do końca 2015 r. wykonano 64 oznaczenia antygenów w BALF.

W trakcie badań prowadzonych w latach 2010-2015 obecność antygenów *Candida* sp. wykryto w 171 próbkach, co stanowiło 2,7% ogólnej liczby badań wykonywanych w tym kierunku. Antygeny *Aspergillus* sp. oznaczono ogółem w 645 próbkach surowicy krwi oraz 8 próbkach BALF. Stanowiło to odpowiednio 8,4% oraz 12,5% z ogólnej liczby oznaczeń wykonanych w kierunku obecności galaktomannanu w próbkach surowicy i w płuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych (Tabela I).

Tabela I. Oznaczanie antygenów krążących *Candida spp.* i *Aspergillus spp.* u pacjentów hospitalizowanych w SP CSK w latach 2010-2015.

Test serologiczny	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ
Oznaczanie antygeny <i>Aspergillus spp.</i> w surowicy krwi	674	616	1435	1686	1615	1657	7683
Dodatni (indeks >0,5)	30	28	89	278	147	73	645 (8,4%)
Ujemny (indeks <0,5)	644	588	1346	1408	1468	1584	7038 (91,6%)
Oznaczanie antygeny <i>Aspergillus spp.</i> w BAL-u	0	0	0	0	0	64	64
Dodatni (indeks >0,5)	-	-	-	-	-	8	8 (12,5%)
Ujemny (indeks <0,5)	-	-	-	-	-	56	56 (87,5%)
Oznaczanie antygeny <i>Candida spp.</i> w surowicy krwi	637	517	1176	1483	1331	1331	6475
Dodatni (stężenie >125pg/ml)	15	14	24	31	70	17	171 (2,7%)
Ujemny (stężenie 62,5-125pg/ml)	612	495	1130	1416	1216	1298	6167 (95,2%)
Wątpliwy (stężenie <62,5pg/ml)	10	8	22	36	45	16	137 (2,1%)
Σ	1311	1133	2611	3169	2946	3052	14222

Większość spośród przeprowadzonych serologicznych oznaczeń wykonano u pacjentów hospitalizowanych w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych (10337 badań) i Klinice Chirurgii Naczyniowej i Transplantacyjnej (547 badań) oraz u chorych objętych opieką jednodniową w Poradni Transplantacyjnej (1176 badań) i Poradni Hematologicznej (597 badań) (Ryc. 1).

Ryc. 1. Liczba wykonanych badań w kierunku obecności grzybiczych antygenów *Candida sp.* i *Aspergillus sp.* w latach 2010-2015.

Najwięcej badań (72,7%) wykonano u pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych. W tej grupie osób stwierdzano także najwięcej wyników dodatnich. I tak, w przypadku poszukiwania antygenów *Candida* sp. były to 123 wyniki dodatnie (72% ogółu wszystkich dodatnich wyników oznaczeń antygeny mannanowego), natomiast w przypadku poszukiwania antygenów *Aspergillus* sp. – 572 wyniki dodatnie oznaczeń w antygeny w surowicy (88,7% ogólnej puli wyników dodatnich) oraz 6 wyników dodatnich oznaczeń w antygeny w próbkach BALF (75%; Tabela II).

Tabela II. Oznaczenia mannanu i galaktomannanu u pacjentów hospitalizowanych w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych w latach 2010-2015.

Test serologiczny	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Σ
Antygen <i>Aspergillus</i> spp. w surowicy krwi							
Dodatni (indeks >0,5)	89	20	79	227	108	49	572 (88,7%)*
Ujemny (indeks <0,5)	351	418	1091	1017	1011	1197	5085
Σ	440	438	1170	1244	1119	1246	5657
Antygen <i>Aspergillus</i> spp. w BAL-u							
Dodatni (indeks >0,5)	-	-	-	-	-	6	6 (75%)*
Ujemny (indeks <0,5)	-	-	-	-	-	15	15
Antygen <i>Candida</i> spp. w surowicy krwi							
Dodatni (stężenie >125pg/ml)	7	11	20	24	50	11	123 (72%)*
Ujemny (stężenie 62,5-125pg/ml)	390	345	883	1015	825	970	4428
Wątpliwy (stężenie <62,5pg/ml)	11	4	19	27	35	12	108
Σ	408	360	922	1066	910	993	4689

*Procent dodatnich badań w stosunku do ogólnej liczby dodatnich badań antygenów odpowiednio *Candida* spp. i *Aspergillus* spp. oznaczonych w latach 2010-2015 (Tab. 1).

DYSKUSJA

Wykrycie w płynach ustrojowych rozpuszczalnych grzybiczych antygenów stanowi obecnie jeden z najważniejszych markerów grzybicy inwazyjnej. Zakażenia o etiologii grzybiczej należą obecnie do najpoważniejszych powikłań u osób z zaburzeniami odporności, szczególnie w transplantologii. Wprowadzenie wspólnej strategii postępowania terapeutycznego oraz rekomendacji dotyczących toku badań laboratoryjnych wpłynęło na poprawę skuteczności leczenia zakażeń potransplantacyjnych, jednak trudności w szybkiej i prawidłowej diagnostyce mykologicznej sprawiają, że zakażenia grzybicze nadal pozostają istotnym wyzwaniem u osób z zaburzeniami odporności, a także u chorych poddanych długotrwałej antybiotykoterapii (10). W tej grupie osób śmiertelność z powodu zakażeń grzybiczych osiąga 70 – 90%, a główną przyczyną zgonu są zakażenia *Aspergillus* sp. (12).

U pacjentów z zaburzeniami odporności jako pierwsze pojawiają się zazwyczaj infekcje spowodowane przez grzyby z rodzaju *Candida* sp. Rozwojowi inwazyjnej postaci kandydozy sprzyja stałe leczenie immunosupresyjne, a u osób po przeszczepieniach komórek krwiotwórczych także współwystępująca choroba „przeciep przeciwko gospodarzowi” (GvHD),

a także jej profilaktyka (11). Na uwagę zasługuje fakt, iż wykrycie obecności antygeny *Candida* sp. na wczesnym etapie zakażenia zależy w dużym stopniu od liczby i częstości oznaczeń wykonanych u danego pacjenta. Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że diagnostyczna czułość testu Platelia *Candida* przy jednorazowym oznaczeniu w pojedynczej próbce surowicy krwi wynosi 58%, zaś wskaźnik ten znacząco wzrasta jeżeli badanie zostanie powtórzone w kolejnych próbkach krwi, pobranych od tego samego chorego (13). Powoduje to, iż pojedynczy wynik ujemny na obecność antygeny *Candida* spp. nie wyklucza całkowicie istnienia inwazyjnej formy kandydozy. Zjawisko to może być spowodowane zbyt niskim stężeniem mannanu, który w przebiegu zakażenia podlega szybkiej eliminacji z krwiobiegu oraz obniżoną czułością metody w stosunku do antygeny produkowanych przez *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. guillierimondi* (7, 13, 14). Ponieważ zaobserwowano korelację między szczytem wykrywalnej antygenemii a dodatnimi wynikami posiewów krwi, celowe jest równoczesne pobieranie próbek krwi do badań serologicznych oraz w celu hodowli i izolacji patogenu (14). W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy próbki, w których wykryto obecność antygeny *Candida* sp. stanowiły jedynie 2,7% spośród ogółu badanych próbek surowicy krwi, przy czym ogromną większość badań wykonano w ramach monitorowania potransplantacyjnego. Odsetek ten może drastycznie wzrosnąć w grupie pacjentów, u których diagnostyka jest ukierunkowana swoiście, tj. obejmuje pacjentów z podejrzeniem inwazyjnego zakażenia o etiologii *Candida*, któremu towarzyszą objawy kliniczne wskazujące bezpośrednio na zakażenie grzybicze, wstępnie potwierdzone za pomocą badań obrazowych. W takiej grupie pacjentów, według obserwacji Verduyn i wsp. (15), odsetek dodatnich próbek surowicy krwi stanowił 31,5%, przy czym wszystkie dodatnie wyniki antygenemii uzyskano przed wyhodowaniem *Candida* z odpowiedniego materiału.

U około 5-15% chorych z zaburzeniami odporności rozwinąć się może inwazyjna aspergiloza, która u 60% z nich kończy się zgonem (16). Zakażenia *Aspergillus* sp. są zazwyczaj spowodowane poprzez inhalację zarodników grzybów obecnych w powietrzu, co prowadzi w początkowej fazie zakażenia do zajęcia zatok przynosowych, a w dalszej perspektywie do zapalenia płuc. U osób immunokompetentnych zarodniki *Aspergillus* sp. docierające do płuc przez drogi oddechowe są zazwyczaj fagocytowane przez makrofagi płucne. Jeśli jednak ich funkcjonowanie jest zaburzone z powodu immunosupresji lub stosowania steroidów, spory grzybów pleśniowych mogą rozwijać się poprzez kiełkowanie, tworząc strzępki. Proces ten może być zahamowany przez neutrofile, jednakże przy współistniejącej neutropenii następuje dalszy rozwój grzyba, wraz z jego penetracją do światła naczyń krwionośnych (11). W związku z tym należy pamiętać, że czułość wykrywania antygeny galaktomannanowego zależy również od miejsca toczącego się zakażenia: w przypadkach zapalenia płuc o etiologii *Aspergillus* sp., ilość antygeny krążącego w surowicy krwi jest wyraźnie niższa w porównaniu z postacią uogólnioną (17). Ponadto, we wczesnych fazach zakażenia, antygen *Aspergillus* może występować w bardzo niskim stężeniu, poniżej granicy czułości metody.

Wykazano, że antygenemia koreluje z klinicznie potwierdzoną aspergilozą oraz z odpowiedzią na zastosowaną terapię przeciwgrzybiczą (18). Monitorowanie próbek klinicznych po wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego daje możliwość oceny skuteczności terapii, jak też umożliwia podjęcie decyzji o włączeniu leczenia alternatywnego (17, 19). Spadek poziomu wykrywanego galaktomannanu wydaje się mieć związek z pomyślnym rokowaniem; z drugiej jednak strony brak antygenemii nie wyklucza aspergillozy lub zakażenia spowodo-

wanego przez inne grzyby pleśniowe (*Fusarium* sp., *Mucor* sp.) (21). Obserwuje się także wyniki fałszywie dodatnie u chorych przyjmujących antybiotyki z grupy β -laktamów (amoksylicyna, piperacylina) lub też u osób z uszkodzoną śluzówką jelit (11, 22).

Spośród 14 222 serologicznych badań przeprowadzonych w SP CSK w latach 2010-2015, obecność galaktomannanu badano w 7683 próbkach surowicy oraz 64 próbkach BALF. Większość dodatnich wyników badań na obecność galaktomannanu (indeks $>$ 0,5) dotyczyła chorych leczonych w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych (88,7% dla próbek surowicy, 75% dla próbek BALF). Wysoką częstość wykrywania galaktomannanu w grupie pacjentów onkohematologicznych, w tym osób po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych, wykazują także badania prowadzone w innych ośrodkach klinicznych (9, 11, 17). Zgodnie z danymi piśmiennictwa, poddawani immunosupresji biorcy narządów unaczynionych są następną w kolejności grupą chorych, u których duże znaczenie diagnostyczne ma monitorowanie obecności i miana antygenów grzybiczych, szczególnie galaktomannanu (12, 16).

PODSUMOWANIE

W związku z rozwojem współczesnej medycyny, a zwłaszcza transplantologii, zakażenia o etiologii grzybiczej należą obecnie do najpoważniejszych powikłań u osób z zaburzeniami odporności. Mimo, że w diagnostyce grzybic dysponujemy coraz większym zakresem metod badawczych, rozpoznanie opiera się często na podstawie stanu klinicznego i badań obrazowych. Szacuje się, że jedynie 20-30% grzybic jest rozpoznawanych przyżyciowo (23). Natomiast u pacjentów z grzybicą potwierdzoną badaniami serologicznymi dodatnie posiewy uzyskuje się w 25-50% przypadków (24). Dlatego badania immunoenzymatyczne (ELISA), wykrywające antygeny krążące w surowicy i płynach ustrojowych, są nadal istotnym uzupełnieniem diagnostyki grzybic inwazyjnych.

WNIOSKI

1. W latach 2010-2015 zaobserwowano znaczny wzrost liczby oznaczeń antygenów grzybiczych wykonywanych metodami immunoenzymatycznymi u pacjentów hospitalizowanych w SP CSK.
2. Znacząca większość dodatnich próbek krwi na obecność galaktomannanu (88,7%) pochodziła od pacjentów onkohematologicznych, co charakteryzuje główną grupę wysokiego ryzyka zakażeń inwazyjnych *Aspergillus* sp.
3. Przeprowadzona analiza wykazała, że 8,3% badań antygenów grzybiczych wykonano u biorców przeszczepów narządów unaczynionych, stanowiących drugą w kolejności grupę ryzyka infekcji grzybiczych.

PIŚMIENNICTWO

1. *Leeflang MMG, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J i in.* Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients (updated). *Cochrane Database Syst Rev* 2015;12. DOI: 10.1002/14651858.CD007394.pub2

2. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP *i in.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813-21.
3. Ascioglu S, de Pauw BE, Donnelly JP, Collette L. Reliability of clinical research on invasive fungal infections: a systematic review of the literature. *Med Mycol* 2001; 39: 35-40.
4. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465-84.
5. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW *i in.* Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: Clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 373-9.
6. Garczewska B, Jarzynka S, Kuś J, Skorupa W, Augustynowicz-Kopeć E. Fungal infection of cystic fibrosis patients — single center experience. *Pneumonol Alergol Pol* 2016; 84: 151-9.
7. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M *i in.* Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* 2002; 51: 433-42.
8. Agrawal S, Hope W, Sinkó J, Kibbler C. Optimizing management of invasive mould diseases. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 45-53.
9. Hadrich I, Mary C, Makni F *i in.* Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with haematological malignancies. *Med Mycol* 2011; 49: 489-94.
10. Dzieciatkowski T, Sulowska A, Przybylski M. Diagnostyka serologiczna i molekularna grzybic inwazyjnych. *Post Mikrobiol* 2015; 54: 291-7.
11. Infections after HSCT. W: Haemopoetic stem cell transplantation. The EBMT Handbook – 6th Edition. Genoa: Forum Service Editore 2012, 197-214. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T (red).
12. Upton A, Kirby KA, Carpenter P *i in.* Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 531-40.
13. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M *i in.* The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010; 14: R222.
14. Yera H, Sendid B, Francois N *i in.* Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 864-70.
15. Verduyn Lunel FM, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D *i in.* Value of *Candida* serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 408-15.
16. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ *i in.* Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1091-100.
17. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y *i in.* Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2733-41.
18. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1-3)-β-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 299-305.
19. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B *i in.* Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2184-6.
20. Salonen J, Lehtonen OP, Teräsjärvi MR *i in.* *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 485-90.

21. *Richardson M, Lass-Flörl C.* Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Suppl 4): 5-24.
22. *Zandijk E, Mewis A, Magerman K* i inni. False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 132-3.
23. *Bodey G, Bueltmann B, Duguid W* i inni. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 99-109.
24. *Stevens DA, Kan VL, Judson MA* i inni. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 696-709.

Otrzymano: 15 IX 2016

Autor: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM,
e-mail: maciej@conexion.pl

Helicobacter pylori – charakterystyka drobnoustroju, patogenezą
i mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń

Helicobacter pylori – characteristics of pathogen, pathogenesis
and microbiological diagnosis of infections

Kornelia Gielarowicz

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

Zakażenia *Helicobacter pylori* stanowią istotną przyczynę zgonów związanych z rakiem żołądka u ludzi na całym świecie. Drobnoustrój ten jest też etiologicznym czynnikiem wrzodów żołądka oraz schorzeń dotyczących zarówno układu pokarmowego jak też innych narządów organizmu człowieka. W prezentowanej pracy przedstawiono charakterystykę patogenu, jego chorobotwórczość i patogenezę zakażeń przez niego wywoływanych. Przedstawiono również krótką charakterystykę metod diagnostycznych służących do diagnostyki zakażeń *H. pylori*.

Słowa kluczowe: *H. pylori*, rak żołądka, wrzód żołądka, diagnostyka zakażeń *H. pylori*

ABSTRACT

Helicobacter pylori has been described as the important cause of cancer deaths in worldwide. It is also etiological agent of gastric ulcers, other diseases related to the digestive system and diseases beyond the digestive system. The study reviews the characteristics of the *H. pylori*. It also describes the pathogenesis and pathogenicity of *H. pylori*. The study presents a description of diagnostic methods used for *H. pylori* diagnosis.

Key words: *H. pylori*, gastric cancer, gastric ulcer, diagnosis of *H. pylori* infections

WSTĘP

Do zakażenia *H. pylori* dochodzi najczęściej w dzieciństwie i często utrzymuje się ono przez całe życie. Zakażenia występują u osób w każdym wieku i dotyczą ponad połowy

ludności świata (13). *H. pylori* wywołuje wiele poważnych dolegliwości ze strony układu pokarmowego, takich jak wrzód żołądka, rak żołądka, czy chłoniak typu MALT oraz poza układem pokarmowym (4,8,17,18.). Przebieg zakażenia uwarunkowany jest nie tylko genotypem danego szczepu *H. pylori*, ale także wiekiem pacjenta, jego stanem zdrowia, dietą oraz trybem życia (29). Wybór metody diagnostycznej służącej do rozpoznania zakażenia *H. pylori* zależy od stanu klinicznego, w którym znajduje się pacjent, dostępności i kosztów testów oraz przyjmowanych leków (3,7).

CHARAKTERYSTYKA DROBNOUSTROJU RYS HISTORYCZNY

Po raz pierwszy informacje na temat bakterii *H. pylori* pojawiły się pod koniec XIX wieku. W 1875 roku niemiecki bakteriolog *Georg Bottcher* wraz ze swoim francuskim współpracownikiem *Michel'em Letulle* jako pierwsi zaobserwowali obecność spiralnych bakterii w śluzówce żołądka ssaków, łącząc przy tym obecność tych bakterii z występowaniem choroby wrzodowej. Przełomowym momentem było wyhodowanie w 1982 roku przez *Barry'ego Marshall* i *Robin'a Warren* spiralnych bakterii w warunkach *in vitro* (22). W 1985 roku *B. Marshall* udowodnił, że wyizolowane bakterie są czynnikiem wywołującym stan zapalny błony śluzowej żołądka oraz choroby wrzodowej. Prowadzone później badania spowodowały wyodrębnienie nowego rodzaju *Helicobacter*, a bakterie, które izolowano od ludzi nazwano *H. pylori* (16). Za swoje odkrycie *R. Warren* i *B. Marshall* zostali uhonorowani w 2005 roku Nagrodą Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny (14).

MORFOLOGIA I FIZJOLOGIA *H. PYLORI*

Bakterie *H. pylori* są Gram-ujemnymi, spiralnymi pałeczkami o helikalnym skręcie, przybierającymi najczęściej kształt litery S lub U. Bakterie osiągają długość do 5 μm i szerokość 0,5 - 1 μm . Ruchliwość bakterii możliwa jest dzięki umieszczonym biegunowo 4 - 6 rzęskom. Obecna na powierzchni komórki bakteryjnej warstwa glikokaliksu warunkuje ich hydrofobowość oraz ujemny ładunek. W kwaśnym środowisku żołądka warstwa ta zostaje częściowo usunięta i następuje odsłonięcie miejsc hydrofobowych na powierzchni bakterii, które zwiększają penetrację śluzu i adhezję do komórek nabłonka żołądka. Do podstawowych enzymów wytwarzanych przez *H. pylori* należą dwa typy ureazy, których największą aktywność obserwuje się w pH = 5 i pH = 7,5, katalaza oraz oksydaza. Do pozostałych należą dysmutaza ponadtlenkowa, fosfataza alkaliczna i kwaśna, fosfoamidaza, transpeptydaza glutamyliowa, esterazy i 20 różnych amidaz arylowych. Optymalne warunki do wzrostu bakterii to warunki mikroaerofilne przy obniżonej prężności tlenu i podwyższonej dwutlenku węgla (5% O₂ + 10% CO₂), pH 5 - 7 oraz temperatura wahająca się między 36°C a 42°C (25,31,35,38).

H. pylori występuje w 3 formach morfologicznych: pałeczkowata (spiralna), ziarniakowata (kokoidalna) oraz formy ziarniakowate umierających bakterii (28). Forma pałeczkowata dominuje, a bakterie występujące w tej formie są zjadliwe oraz infekcyjne. Tworzenie form ziarniakowatych odbywa się zwykle w niesprzyjających warunkach. Forma ziarniakowata nie wyrasta na podłożach mikrobiologicznych w postaci kolonii bakteryjnych, a bakterie są mniej zjadliwe. Może dojść również do obumierania komórek bakteryjnych w postaci degeneracyjnych form kokoidalnych (28,30).

W środowisku naturalnym *H. pylori* zazwyczaj żyją w społeczności mikroorganizmów na powierzchni różnych materiałów. Otoczone są biofilmem o charakterze polisacharydu, który pozwala bakterii na przystosowanie się do warunków środowiskowych (6, 7, 14).

H. pylori mogą kolonizować żołądek jako bakterie wolne, zawieszona w śluzie, na zasadzie adherencji powierzchniowej lub kolonizacji międzykomórkowej (34). Do miejsca ich najczęstszej kolonizacji należy błona śluzowa odźwiernika żołądka, ale niekiedy wykazuje się również obecność tych bakterii w dwunastnicy, przełyku, płycie nazębnej, a także próbkach kału (38).

CZYNNIKI WIRULENCJI

W patogenezie chorób wywoływanych przez *H. pylori* istotną rolę odgrywają czynniki wirulencji (zjadliwości) bakterii. Umożliwiają one kolonizację, namnażanie się i przeżycie bakterii. Dodatkowo mogą one uszkadzać komórki nabłonkowe żołądka, przyczyniając się tym do powstawania stanu zapalnego w błonie śluzowej oraz zaburzeń produkcji kwasu solnego. Do czynników tych należą: ureaza, cytotoksyna wakuolizująca A (ang. Vacuolating Cytotoxin A, VacA), lipopolisacharyd (ang. Lipopolysaccharide, LPS), białko CagA (ang. Cytotoxin Associated Protein A) białka regionu wyspy patogenności Cag - PAI (ang. Cag Pathogenicity Island), katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa, adhezyny, antygeny Lewis, a także rzęski (1,9,37,39).

Wśród czynników zjadliwości wyróżniamy: czynniki kolonizacji, czynniki przetrwania i czynniki odpowiedzialne za działanie toksyczne w stosunku do błony śluzowej żołądka.

Do czynników kolonizacji zaliczamy zdolność bakterii do produkcji ureazy, przylegania do komórek nabłonka (adhezyny), a także poruszania się w gęstym śluzie (rzęski, spiralny kształt). Do czynników umożliwiających przetrwanie *H. pylori* w środowisku żołądka oraz oporność na fagocytozę należą ureaza, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa. Umożliwia to również oporność na mechanizmy humoralnej obrony gospodarza. Ostatnią grupą są czynniki odpowiedzialne za toksyczne działanie w stosunku do śluzówki żołądka. Są nimi: VacA, amoniak, wyspa patogenności cag - PAI oraz LPS, które bezpośrednio uszkadzają błonę śluzową żołądka, a także pośrednio pobudzają mediatory reakcji zapalnej (19,27).

EPIDEMIOLOGIA ZAKAŻEŃ *H. PYLORI*

H. pylori zamieszkuje żołądki ponad połowy ludzkiej populacji na świecie. Częstość występowania zakażeń *H. pylori* w krajach rozwijających się jest znacznie wyższa niż w krajach rozwiniętych. Do czynników wpływających na częstość oraz występowanie zakażenia zaliczyć należy wiek, płeć, predyspozycję genetyczną, pochodzenie etniczne, a także poziom edukacji i higieny. Geograficzne różnice w częstości występowania *H. pylori* wiążą się z różną szybkością nabywania bakterii w pierwszych latach życia. Zmniejsza się ono szybciej w krajach rozwiniętych, niż w krajach rozwijających się, co prawdopodobnie związane jest z poprawą higieny (14).

W Polsce w latach 2002-2003 były prowadzone badania dzieci i dorosłych zamieszkających w różnych regionach kraju, mające na celu sprawdzenie zależności statusu socjoekonomicznego oraz warunków zamieszkania na częstość zakażenia bakteriami *H. pylori*. Badania te dowiodły, iż niski status socjoekonomiczny oraz uboższy stan sanitarno-hi-

gieniczny są istotnymi czynnikami sprzyjającymi zakażeniu *H. pylori* zarówno u dzieci jak i u dorosłych. Obecność *H. pylori* stwierdzono u 32% dzieci i 84% osób dorosłych. Ogółem zakażenie *H. pylori* wykryto u 58% badanych osób (20).

DROGI ZAKAŻENIA

Sposób transmisji *H. pylori* jest jednym z najbardziej kontrowersyjnych obszarów badań tego patogenu. Do zakażenia może dojść drogami tj. oralno-oralną, gastryczno-oralną, fekalno-oralną lub ich kombinacją. Najbardziej prawdopodobną drogą zakażenia jest spożycie pokarmu skażonego *H. pylori* (2,14).

1) Droga oralno-oralna

Sugeruje się, że *H. pylori* wchodzi w skład flory bakteryjnej jamy ustnej i niezależnie od obecności lub braku infekcji jama ustna zostaje traktowana, jako rezerwuuar *H. pylori*, a przekaz oralno-oralny jest uznawany, za wiarygodną drogę zakażenia tą bakterią (14). Ten sposób przenoszenia może być nasilany przez specyficzne nawyki żywieniowe w różnych regionach świata tj. żucie pokarmu przez matki przed karmieniem dzieci w niektórych krajach Afryki, używanie pałeczek i wspólne jedzenie w społeczności chińskiej, a także poprzez pocałunki oraz kontakt ze śliną skażoną bakteriami *H. pylori* (2,14).

2) Droga gastryczno-oralna

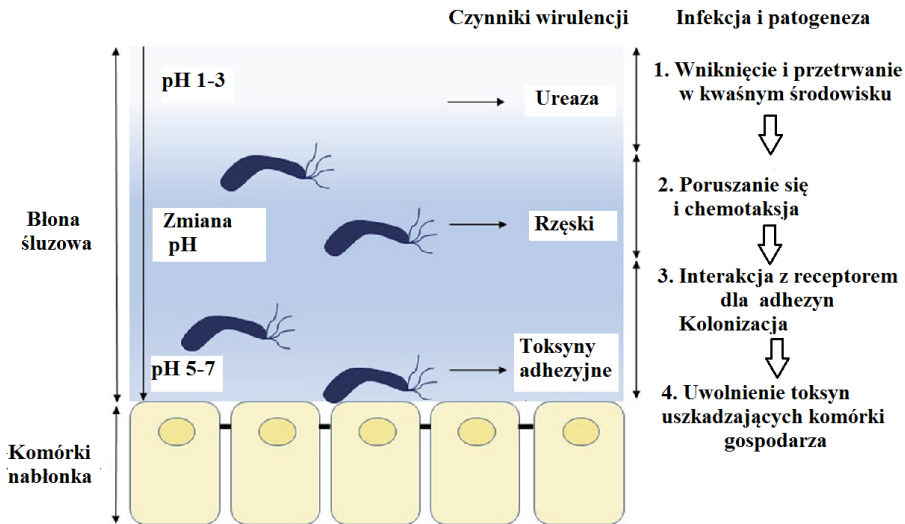
Żołądek człowieka jest podstawową niszą dla *H. pylori*, dlatego też sugeruje się, że droga gastryczno-oralna pośredniczy w przenoszeniu bakterii poprzez refluks soków żołądkowych. *H. pylori* wykryto w soku żołądkowym, w wymiocinach zainfekowanych pacjentów, a nawet z powietrza pobranego podczas wymiotowania (14). Transmisja gastryczno-oralna jest główną drogą przenoszenia bakterii *H. pylori* wśród małych dzieci, wśród których wymioty i refluks żołądkowy przełyku są powszechne (2). Gastryczno-oralna hipoteza wyjaśnia również doniesienia związane z epidemią zapalenia błony śluzowej żołądka u pacjentów poddawanych powtarzanym badaniom endoskopowym (2,14).

3) Droga fekalno-oralna

H. pylori jest wrażliwa na bakteriobójcze działanie żółci, więc w normalnych warunkach, pasaż *H. pylori* przez jelita i jej wykrycie w stolcu jest mało prawdopodobne (2,14). Pośrednim źródłem *H. pylori*, poza układem pokarmowym człowieka, mogą być pożywienie, woda i zwierzęta. *H. pylori* lub też DNA bakterii zostały wykryte w każdym z tych źródeł. Jednak nie ma dostatecznych dowodów na to, że są to podstawowe i naturalne drogi transmisji tej bakterii (14).

PATOGENEZA I CHOROBOTWORCZOŚĆ

Dzięki swej morfologii i czynnikom wirulencji *H. pylori* łatwo przedostaje się przez śluz pokrywający błonę śluzową żołądka, działa cytotoksycznie i uszkadza śluzówkową barierę ochronną, a enzymy przez nią wydzielane zapoczątkowują miejscową i uogólnioną odpowiedź komórkową i humoralną (Ryc.1). Błona śluzowa żołądka (głównie okolica przedodźwiernikowa), a także obszary ognisk metaplazji nabłonka żołądkowego przełyku i dwunastnicy są częstym miejscem bytowania tych bakterii (4).



Ryc. 1. Etapy kolonizacji bakterii *H. pylori* do komórek nabłonkowych żołądka. Zmodyfikowano wg (36).

Pierwszym krokiem do kolonizacji błony śluzowej żołądka jest przetrwanie bakterii w środowisku kwasów żołądkowych, gdzie pH wynosi około 1,5 (36). *H. pylori* produkuje enzym ureazę, pod wpływem którego z mocznika powstaje amoniak, który neutralizuje kwaśne środowisko na powierzchni komórek nabłonkowych żołądka (pH wokół bakterii podwyższa się do około 6,7), dzięki czemu *H. pylori* może przetrwać w niekorzystnych warunkach panujących w żołądku, a także przedostać się do nabłonka (27,36). Amoniak ma również bezpośredni jak i pośredni wpływ na powstawanie uszkodzeń nabłonkowych komórek żołądka. W środowisku wodnym dysocjuje uwalniając jon amonowy (NH_4^+) i wodorotlenowy (OH^-). Jony OH^- mają toksyczny wpływ na komórki (11).

Pomimo zdolności do neutralizacji środowiska *H. pylori* musi dostać się do komórek nabłonkowych żołądka, gdzie pH jest bliskie neutralnemu. Adhezja bakterii do komórek nabłonkowych żołądka umożliwia drobnoustrojom pobranie substancji odżywczych oraz chroni je przed przemieszczeniem.

Przebieg samego zakażenia *H. pylori* może być bezobjawowy, dawać objawy zakażenia żołądka, albo prowadzić do powstawania wrzodów żołądka. Reakcją na odpowiedź immunologiczną (humoralną i komórkową) skierowaną przeciwko *H. pylori* jest stan zapalny. Długotrwała obecność bakterii w żołądku grozi przejściem zapalenia błony śluzowej żołądka w zanikowe zapalenie żołądka, które w kolejnym etapie może prowadzić do przemian nowotworowych (15,38).

Pierwszym etapem infekcji *H. pylori* jest obrzęk i rozszerzenie naczyń krwionośnych, podczas którego następuje napływ komórek odczynu zapalnego (neutrofilów, makrofagów, limfocytów), którym towarzyszy przewlekła reakcja zapalna błony śluzowej żołądka. Przewlekłość zapalenia części przedodźwiernikowej żołądka zaburza proces homeostazy i regulacji hormonalnej, a także prowadzi do zwiększenia wydzielania gastryny i zmniejszenia wydzielania somatomedyn. Wzrost poziomu gastryny wpływa na komórki

okładzinowe żołądka, w wyniku czego następuje nadmierne wydzielanie kwasu solnego przez te komórki. Zwiększona ilość kwaśnej treści z żołądka wraz z obecnymi bakteriami zostaje przesunięta do dwunastnicy, co stwarza dodatkowe miejsce dla kolonizacji *H. pylori*. Wszystkie te czynniki, a także dodatkowo zmniejszone wydzielanie wodorowęglanów w dwunastnicy wpływa na powstawanie wrzodów zarówno w żołądku jak i dwunastnicy. Wrzody to głębokie ubytki śluzówki w miejscu poddanemu długotrwałemu działaniu kwasu żołądkowego. Wrzód żołądka występuje najczęściej na granicy błony śluzowej i obszaru gruczołów trawiennych i odźwiernikowych, natomiast wrzód dwunastnicy ma swoją lokalizację w opuszcze dwunastnicy. Choroba wrzodowa (przewlekły wrzód) charakteryzuje się możliwością samoistnego gojenia, skłonnością do nawrotów oraz dobową rytmiką dolegliwości bólowych (4,12,15,18).

Brak skutecznej eradykacji i znaczny wzrost liczby bakterii w żołądku powoduje rozprzestrzenianie się zapalenia na trzon żołądka. Zakażenie utrzymujące się przez długi okres czasu może prowadzić do zanikowych zmian błony śluzowej oraz zniszczenia warstwy gruczołowej. W wyniku tego procesu nabłonek typu żołądkowego zostaje zastąpiony przez nabłonek jelitowy, a po latach może dojść do rozwoju dysplazji, która uważana jest za stan przedrakowy (4,18,39).

Obecność przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka spowodowanego zakażeniem bakteriami *H. pylori* jest skorelowane z występowaniem raka żołądka i chłoniaka błony śluzowej żołądka wywodzący się z tkanki limfatycznej (ang. Lymphoma of Gastric Mucosal Associated Lymphoid Tissue; chłoniak MALT). Około 70% wszystkich przypadków raka żołądka na świecie można bezpośrednio przyporządkować poprzedzającemu go zakażeniu *H. pylori* (17). Indukcja oksydacyjnego i azotowego stresu podczas zakażenia wywołanego przez *H. pylori* jest ważnym molekularnym mechanizmem biorącym udział w kancerogenezie żołądka. W konsekwencji tego działania następuje rozpoczęcie cyklu naprawy uszkodzeń komórkowych i DNA. Ostatecznie wyczerpane zostają mechanizmy obrony poprzez przeciwutleniające w konsekwencji czego następuje nagromadzenie błędów genetycznych, co prowadzi do przyspieszenia obrotu metabolicznego komórek żołądka. Trwa to do momentu, w którym następuje nieunikniona transformacja nowotworowa (15,39).

Częstość występowania raka żołądka w ostatnich latach spadła w wielu rozwijających się krajach, jednak jest wciąż istotną przyczyną zgonów związanych z rakiem żołądka na całym świecie (3, 17). Chłoniak MALT jest znacznie mniej powszechny niż rak żołądka i stanowi 3% wszystkich guzów żołądka. Chłoniak żołądka MALT jest nowotworem niezróżnicowanym limfocytów B wywodzącym się z marginalnej strefy grudek chłonnych. Dowody na powiązanie *H. pylori* z chłoniakiem typu MALT limfocytów B są bardzo silne, a regresja nowotworu we wczesnym stadium u pacjentów po przeprowadzonej eradykacji bakterii antybiotykoterapią jest natychmiastowa (tydzień do miesiąca) (17,26).

Gruczolakoraki żołądka zazwyczaj powstają w dystalnej części żołądka. Wyróżnia się dwa główne histologiczne podtypy raka żołądka silnie związane z poprzedzającym zakażeniem *H. pylori*. Są to: podtyp jelitowy i podtyp rozlany. Podtyp jelitowy jest dominującą formą występującą u osób w większości rozwijających się krajów (17,32).

Skutki zakażenia *H. pylori* nie dotyczą tylko układu pokarmowego. Odnotowano również inne schorzenia, które powiązane z obecnością tej bakterii. Dotyczą one zarówno dzieci jak i dorosłych. Zalicza się do nich przewlekłą idiopatyczną małopłytkowość, czy niedokrwistość z niedoboru żelaza (8,30).

DIAGNOSTYKA ZAKAŻEŃ *H. PYLORI*

Metody diagnostyczne służące do rozpoznania zakażenia *H. pylori* dzielą się na inwazyjne i nieinwazyjne (Tab. 1). Wybór metody zależy między innymi od stanu klinicznego, w którym znajduje się pacjent (3,24,33).

Tabela I. Metody diagnostyczne służące do rozpoznania zakażenia *H. pylori* wg (3).

Nazwa testu	Czułość	Swoistość	Zalety	Uwagi
Testy nieinwazyjne				
Test serologiczny z przeciwciałami IgG	>80%	50% – IgG 90% – IgG i IgA	Tani i szybki test, przydatny w badaniach przesiewowych	Dodanie testu z IgA zwiększa swoistość; nieprzydatny do potwierdzania aktualnego zakażenia i eradykacji; przeciwciała obecne 6-12 mies. po eradykacji
Test oddechowy z mocznikiem znakowanym ¹³ C lub ¹⁴ C	90-95%	90-98%	Rozpoznaje aktualne zakażenie i ocenia eradykację; bezpieczny z nieradioaktywnym ¹³ C	Drogi; w teście z ¹⁴ C niewielka dawka promieniowania; 14 dni przed testem należy wstrzymać leczenie Inhibitorem Pompy Protonowej (IPP), a antybiotyki i bizmut na 6 tyg.*
Badanie antygenów <i>H. pylori</i> w stolcu	ok. 90%	ok. 90%	Tani i szybki test do rozpoznawania aktualnego zakażenia i oceny eradykacji	Optymalny test ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi; 14 dni przed testem należy wstrzymać leczenie IPP
Testy inwazyjne				
Test ureazowy (CLO-test)	Ok. 95%	Ok. 95%	Tani i szybki test (wynik do 15 min)	Wynik może być fałszywie ujemny w czynnym/niedawnym krwawieniu; 14 dni przed testem należy wstrzymać leczenie IPP
Badanie histologiczne	Ok. 50%	Ok. 100%	Ocenia zmiany w błonie śluzowej	Badanie drogie i czasochłonne; identyfikuje wszystkie bakterie spiralne; 14 dni przed testem należy wstrzymać leczenie IPP
Hodowla bakteryjna	Ok. 50%	Ok. 100%	Użyteczna w razie nieskutecznej eradykacji; ocenia wrażliwość <i>H. pylori</i> na antybiotyki	Badanie drogie i czasochłonne; trudne warunki hodowli; 14 dni przed testem należy wstrzymać leczenie IPP

*Zalecenie dotyczące wstrzymania leczenia antybiotykami i solami bizmutu odnosi się do wszystkich badań, z wyjątkiem testu serologicznego.

Metody nieinwazyjne.

Test immunoenzymatyczny ELISA do poszukiwania swoistych przeciwciał dla antygenów *H. pylori*. Testem tym poszukuje się przeciwciał klasy IgG i IgA w surowicy osób podejrzanych o zakażenie *H. pylori*. Przeciwciała te skierowane są przeciwko antygenowi CagA, najbardziej specyficznemu antygenowi *H. pylori* (3,7,21,34). Wykrycie przeciwciał może być pomocne w diagnostyce zakażenia *H. pylori*, gdy u pacjenta są przeciwwskazania do wykonania badania endoskopowego. Test ten nie wykrywa niestety zmian lokalnych powstających pod wpływem zakażenia *H. pylori* w żołądku, dając wyniki fałszywie ujemne. Na jego wynik nie mają wpływu IPP, H₂- blokery czy podawane antybiotyki. Podwyższony poziom przeciwciał klasy IgG lub IgA może utrzymywać się we krwi przez 6-12 miesięcy dlatego test ten nie jest wykorzystywany to oceny skuteczności eradykacji *H. pylori* (3,7,34).

Test oddechowy ze znakowanym węglem ¹³C lub ¹⁴C. Jest to bardzo szybki i prosty test potwierdzający czynne zakażenie bakterią *H. pylori*. Test ten jest uznawany za tzw. złoty standard diagnostyczny. Można go stosować do oceny eradykacji bakterii po 4 tygodniach od zakończenia leczenia. Zasada testu polega na rozkładzie mocznika znakowanego izotopem ¹³C lub ¹⁴C do amoniaku i dwutlenku węgla przez bakteryjną ureazę *H. pylori*. Mierząc ilość wydychanego z powietrzem znakowanego CO₂ można stwierdzić obecność *H. pylori* w żołądku badanego pacjenta (3,7).

Poszukiwanie antygenów bakteryjnych w próbkach kału. Test wykrywający antygeny *H. pylori* w stolcu potwierdza nie tylko aktualne zakażenie, ale również pozwala ocenić skuteczność eradykacji. Prowadzone badania dowiodły, iż test ten jest równie przydatnym i niezawodnym testem jak wyżej opisany mocznikowy test oddechowy. Jego skuteczność dowiedziono również podczas terapii inhibitorem pompy protonowej (3,7,34). Istnieją dwie metody oznaczania antygeny *H. pylori* w kale wykorzystujące przeciwciała monoklonalne, a mianowicie metoda immunoenzymatyczna (enzyme immunoassay, EIA) i immunochromatograficzna. Zaletą pierwszej jest jej większa precyzja, przy porównywalnej metodą immunochromatograficzną swoistości i czułości (ok.90%). Natomiast metoda immunochromatograficzna jest prosta i do jej wykonania nie jest wymagane specjalne wyposażenie (23).

Metody inwazyjne.

Test ureazowy. Test ureazowy wykrywa aktualne zakażenie *H. pylori*, a jego pozytywny wynik jest wystarczający do wdrożenia leczenia eradykacyjnego. Jest testem stosunkowo niedrogim i przede wszystkim szybkim. Może dawać wyniki fałszywie ujemne w przypadku wystąpienia krwawienia z górnego odcinka przewodu pokarmowego, u osób leczonych IPP, H₂ blokerami, antybiotykami czy preparatami bizmutu. Wyniki fałszywie dodatnie występują rzadko i mogą być spowodowane zakażeniem np. pałeczkami *Klebsiella* lub *Proteus*. W szybkim teście ureazowym wykorzystuje się zdolność *H. pylori* do wytwarzania ureazy. Pobrany wycinek błony śluzowej przenosi się na płytkę zawierającą mocznik, który rozkładany jest przez ureazę. O wyniku dodatnim świadczy zmiana zabarwienia z żółtego na czerwony płytki pod wpływem zmiany pH (alkalizacja środowiska) (3,7,29,34).

Badanie histologiczne. Histologiczne badanie wycinka błony śluzowej jest uważane za złoty standard w bezpośredniej diagnozie *H. pylori* (3,15). Metoda ta polega na barwieniu pobranych od pacjenta biopsatów eozyną i hematoksyliną oraz dodatkowo me-

todą Giemzy lub Genta. Umożliwia ona obserwację zmian zachodzących w błonie śluzowej i zaawansowania stanu zapalnego, liczby bakterii, a także wykluczenie złośliwości obecnych zmian (3,29). Możliwe jest też dzięki badaniu bazującemu na fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, wykrycie oporności *H. pylori* na klarytromycynę (34).

Hodowla bakteryjna. Jest to rzadko stosowana metoda diagnostyczna ze względu na trudności w wyhodowaniu *H. pylori*. (3). Odsetek skutecznie wyhodowanych bakterii z wycinków biopsyjnych pobranych podczas endoskopii wynosi od 50-70% (23). Jedną z największych zalet tej metody jest możliwość oceny lekowrażliwości *H. pylori*. Metoda hodowli bakteryjnej jest zalecana, przy co najmniej dwukrotnej nieudanej eradykacji oraz uczuleniu na antybiotyk, który jest zalecany w schemacie eradykacyjnym (29,34). Hodowlę prowadzi się w temperaturze 37°C przez 4 do 5 dni w warunkach mikroaerofilnych przy obniżonej prężności tlenu i podwyższonej dwutlenku węgla (5% O₂ + 10% CO₂ + 85% N₂) (23,29,33,36). Bakterie rosną na podłożu Campy-BA (Campy- Blood Agar), na agarze z krwią i agarze czekoladowym. Kolonie *H. pylori* są przejrzyste i szare oraz dają dodatnie próby na katalazę, oksydazę i ureazę. Próba na ureazę wykonywana na podłożu Christensena jest bardzo aktywna, co daje możliwość szybkiej identyfikacji *H. pylori* zarówno kilkanaście minut po posiewie jak i bezpośrednio w materiale biopsyjnym (31).

Metody molekularne (PCR). Metodami molekularnymi poszukuje się genów odpowiedzialnych za zjadliwość bakterii (*cagA*, *vacA*) oraz za mutacje prowadzące do oporności na makrolidy i fluorochinolony (3,29,34). Badania dowiodły, iż metodą PCR można potwierdzić zakażenie *H. pylori* z wycinków biopsyjnych nawet u pacjentów z krwawiącymi wrzodami żołądkowymi, podczas gdy inne badania dawały wyniki fałszywie ujemne (34). Materiałem badanym mogą być wycinki biopsyjne z miejsc objętych zmianami w błonie śluzowej żołądka, ślina i kał (3,34). Ze względu na pochodzenie materiału, z którego wykonywane jest badanie PCR zaliczany jest do metod nieinwazyjnych (34). Zaletą tych metod jest ich duża swoistość, lecz ze względu na koszt i trudną dostępność nie są to metody rutynowo stosowane w diagnostyce zakażenia *H. pylori* (3).

PODSUMOWANIE

Po odkryciu *H. pylori* w 1982 roku, które przypisane jest R. Warrenowi oraz B. Marshallowi, przeprowadzono wiele badań dotyczących tych drobnoustrojów. Wciąż jednak szuka się odpowiedzi na pytanie, czy bakteria ta jest pasożytem czy komensalem, a także, w jaki sposób drobnoustroj ten wymyka się mechanizmom obronnym gospodarza i prowadzi do stabilnego zasiedlenia śluzówki żołądka.

PIŚMIENNICTWO

1. Albrecht P, Łazowska I. Choroba wrzodowa oraz zakażenie *Helicobacter pylori* u dzieci. Przeg Gastroenterologiczny 2007; 2: 56-64.
2. Azevedo NF, Guimarães N, Figueiredo C i inni. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. Crit Rev Microbiol 2007; 33: 157-69.
3. Bartnik W, Celińska-Cedro D, Dzieniszewski J, Łaszewicz W i inni. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące diagnostyki i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori*. Gastroenterologia Praktyczna 2014; 2: 33-41.

4. Bąk - Romaniszyn L, Zeman K. Zakażenie *Helicobacter pylori* u dzieci - aktualne możliwości diagnostyczno-terapeutyczne i doświadczenia własne. *Terapia* 2010; 6: 17-22.
5. Cellini L, Grande R, Di Campli E i inni. Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. *J Appl Microbiol* 2008; 105: 761-9.
6. Cheng-Yen K, Bor-Shyang S, Jiunn-Jong W. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J* 2016; 39: 14-23.
7. Dore MP, Pes GM, Bassotti G, Usai-Satta P. Dyspepsia: When and how to test for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Res Pract* 2016; 2016: 1-9.
8. Dzieniszewski J, Jarosz M. Ustalenia Grupy Roboczej PTG-E dotyczące postępowania w zakażeniu *Helicobacter pylori* - consensus 2008. *Gastroenterol Pol* 2008; 15: 323-31.
9. Dzierżanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. α -medica press. Bielsko Biala 2008, 305-7.
10. García A, Salas-Jara MJ, Herrera C, González C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 5632-8.
11. Godlewska R, Jagusztyn-Krynicka EK. Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki. *Post Mikrobiol* 2003; 42: 115-37.
12. Hunt R H, Camilleri M, Crowe S E i inni. The stomach in health and disease. *Gut* 2015; 64: 1650-68.
13. Jagusztyn-Krynicka E, Godlewska R, Laniewski P. *Helicobacter pylori*- patogen roku 2005. *KOSMOS* 2005; 54: 307-19.
14. Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? *Gut Pathogens* 2010; 2: 1-12.
15. Khatoon J, Rai RP, Prasad KN. Role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer: Updates. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8: 147-58.
16. Kidd M, Modlin IM. A century of *Helicobacter pylori*: Paradigms lost- paradigms regained. *Digestion* 1998; 1: 1-15.
17. Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD, Moss SF. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett* 2012; 305: 228-38.
18. Konturek SJ. Choroba wrzodowa- patofizjologia i leczenie. *Przew Lek* 2001; 4: 98-107.
19. Kuklińska U, Lasica AM, Jagusztyn-Krynicka EK. Białko CagA *Helicobacter pylori*, jako pierwsza zidentyfikowana bakteryjna onkoproteina. *Post Mikrobiol* 2011; 50: 97-106.
20. Łaszewicz W, Iwańczak F, Iwańczak B. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults depending on socioeconomic status and living conditions. *Adv Med Sci* 2014; 59: 147-50.
21. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C and others. Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-64.
22. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 323: 1311-5.
23. Miftahussurur M, Yamaoka Y. Diagnostic Methods of *Helicobacter pylori* Infection for Epidemiological Studies: Critical Importance of Indirect Test Validation. *BioMed Research International* 2016; 2016: 1-14.
24. Ministerstwo Zdrowia. Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki antybiotykowej zakażeń w szpitalu. Narodowy Instytut Leków. Warszawa 2015, 38-41.
25. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM Press. Washington 2001, 53-67.
26. Moleiro J, Ferreira S, Lage P, Pereira AD. Gastric malt lymphoma: Analysis of a series of consecutive patients over 20 years. *United European Gastroenterol J* 2016; 4: 395-402.
27. Parzęcka M, Czerwionka-Szaflarska M. Molekularne aspekty wirulencji *Helicobacter pylori* i ich znaczenie kliniczne. *Gastroenterol Pol.* 2008; 15: 33-36.

28. *Percival Andersen L, Lone R. Helicobacter pylori*- coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56: 112-5.
29. *Polińska B, Matowicka – Karna J, Kemon H. Diagnostyka zakażeń Helicobacter pylori. Diagn Lab* 2008; 44: 513-20.
30. *Rudnicka K, Graczykowski M, Tenderenda M, Chmiela M. Formy morfologiczne Helicobacter pylori i ich przypuszczalna rola w transmisji zakażeń. Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 227-37.
31. *Szewczyk EM. Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa* 2007, 138-41.
32. *Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of Helicobacter pylori pathogenesis, diagnosis and treatment. World J Gastroenterol* 2014; 20: 12781–808.
33. *Tongtawee T, Kaewpitoon S, Kaewpitoon N, Dechsukhum C and others. Diagnosis of Helicobacter pylori Infection. Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17:1631-5.
34. *Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Me' graud F. Epidemiology and Diagnosis of Helicobacter pylori Infection. Helicobacter* 2012; 17: 1-8.
35. *Urban J. Helicobacter pylori - charakterystyka i patogenność. Dent Med Probl* 2010; 47: 482-6.
36. *Walton EL. Helicobacter pylori's road to colonization. Biomed J* 2016; 39: 1-4
37. *Yamamoto Y, Friedman H, Hoffman PS. Helicobacter pylori infection and immunity. Springer Science + Business Media. New York* 2002, 1-15.
38. *Zaremba ML, Borkowski J. Mikrobiologia lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa* 2004, 233-9.
39. *Zhang RG, Duan GC, Fan QT, Chen SY. Role of Helicobacter pylori infection in pathogenesis of gastric carcinoma. World J Gastrointest Pathophysiol* 2016; 7: 97–107.

Otrzymano: 25 VII 2016

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

Szczepienia kobiet w ciąży

Vaccination during pregnancy

Marta Prygiel, Ewa Mosiej, Aleksandra A. Zasada

Zakład Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Mimo ogromnego rozwoju wakcynologii na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci, szczepienia kobiet w ciąży wciąż budzą wiele kontrowersji. Jak wynika z danych piśmiennictwa większość z nich jest nie tylko skuteczna, ale również bezpieczna. W pracy omówiono zagadnienia dotyczące szczepień kobiet ciężarnych, ze szczególnym uwzględnieniem rekomendacji najważniejszych Instytucji Ochrony Zdrowia Publicznego dla tej grupy kobiet.

Słowa kluczowe: *szczepienia, ciąża, rekomendacje do szczepień*

ABSTRACT

Despite the enormous development of vaccinology in recent decades, vaccinations of pregnant women are still controversy. According to data from the literature, most of them are not only effective but also safe. The paper discusses the issues of vaccination among pregnant women, with special accent on the recommendations of the most important Institutions of Public Health for this group of women.

Key words: *vaccines, pregnant, recommendations for vaccination*

WSTĘP

Szczepienia miały istotny wpływ na zmniejszenie zachorowalności i śmiertelności z powodu wielu chorób na świecie i z tego względu uważane są za jedno z dziesięciu największych osiągnięć w dziedzinie zdrowia publicznego XX wieku (13). W ostatnim czasie obserwuje się wiele zmian w podejściu do szczepień, w tym szczepień kobiet w ciąży. Szczepienia kobiet planujących ciążę, kobiet ciężarnych, kobiet w porożu oraz przez cały okres karmienia piersią, zapewniają ochronę przed zachorowaniem na ciężkie choroby za-

równy kobiecie ciężarnej, która ze względu na swój odmienny stan jest bardziej podatna na zakażenia i ryzyko ich powikłań, jak i jej nowo narodzonemu dziecku. Mechanizm ochrony polega na przekazywaniu w postaci czynnego transferu przezłożyskowego przeciwciał klasy IgG z krwi matki do krwi płodu, szczególnie w II i III trymestrze ciąży oraz na wydzielaniu przeciwciał klasy IgA do mleka matki karmiącej. Bierne uodpornienie dziecka zapewnia ochronę niemowlęcia w czasie jego największej wrażliwości na zachorowanie (tj. w okresie dwóch miesięcy od porodu), kiedy dziecko poddane jest czynnemu uodpornieniu w ograniczonym zakresie, a jego układ immunologiczny dojrzewa (28).

ZAPOCZĄTKOWANIE SZCZEPIEŃ WŚRÓD KOBIECI CIĘŻARNYCH

Koncepcja, że szczepienie w czasie ciąży może chronić noworodka nie jest nowa. Już w 1879 roku stwierdzono, że noworodki urodzone przez matki, które otrzymały szczepionkę przeciwko ospie prawdziwej w czasie ciąży były chronione przed wirusem ospy we wczesnym okresie życia. W 1982 roku na modelu mysim, wykazano ochronne działanie matczyne przeciwciał przeniesionych na potomstwo. Na początku XX wieku uznano, że duża liczba niemowląt odpornych na wiele chorób w ciągu pierwszych kilku miesięcy życia, zawdzięcza tą ochronę przeciwciałom matczynym, które przeszły z krwi matki do płodu (39).

Szczepienie toksoidem tężcowym w czasie ciąży jest stosowane od wielu lat w krajach rozwijających się, w celu ochrony noworodków przed zachorowaniem na tężec noworodkowy. Badania przeprowadzone w 1960 roku przedstawiły dowody na to, że poprzez szczepienie matek ciężarnych można zapobiegać tężcowi noworodkowemu wśród dzieci urodzonych w wiejskich obszarach Kolumbii. Indeks zgonów noworodków urodzonych przez matki nieuodpornione został zredukowany z 11,6 na 100 urodzeń do zera wśród noworodków urodzonych przez matki uodpornione w czasie ciąży dwoma lub trzema dawkami szczepionki przeciw tężcowi podanymi w 6 tygodniowych odstępach (36). Od wczesnych lat 90-tych, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Oświaty, Nauki i Kultury (UNESCO) w ramach Światowej Inicjatywy Eliminacji Tężca Noworodkowego „The Global Maternal and Neonatal Tetanus Elimination Initiative”, prowadzą masowe programy szczepień przeciw tężcowi kobiet w ciąży z krajów słabo rozwiniętych, co w znacznej mierze przyczyniło się do zmniejszenia częstości zgonów z powodu tężca noworodków urodzonych w okresie 1988 – 2010. Inicjatywa ta doprowadziła do redukcji zgonów noworodków z powodu tężca aż o 93% (49). Szacuje się, że tylko w 2011 roku kobietom ciężarnym podano co najmniej 100 milionów dawek szczepionki przeciw tężcowi (20).

Pierwsze zalecenia do stosowania szczepionek przeciw grypie były już w 1960 roku (3). W 1990 roku Amerykański Komitet Doradczy do Spraw Szczepień Ochronnych (Advisory Committee on Immunization Practices - ACIP), obserwując zwiększone ryzyko powikłań pogrypowych u kobiet ciężarnych, wydał pierwsze zalecenia do stosowania szczepionek przeciw grypie wśród kobiet ciężarnych. Zalecenia te dotyczyły tylko kobiet ciężarnych z tzw. grup ryzyka, czyli kobiet obarczonych dodatkowymi obciążeniami zdrowotnymi takimi jak choroby kardiologiczne, astma, cukrzyca czy choroba Addisona i zawierały przeciwwskazanie do stosowania w pierwszym trymestrze ciąży (6). W 1995 roku, na podstawie coraz większej liczby występowania przypadków grypy wśród kobiet ciężarnych oraz

dostępności do szerszej ilości badań w grupie kobiet ciężarnych, ACIP rozszerzył zalecenia do stosowania szczepień przeciw grypie jako rekomendowane dla wszystkich kobiet będących w ciąży, ale tylko w trzecim trymestrze ciąży (5), a w 1997 roku, po zwiększonej ilości hospitalizacji kobiet ciężarnych z powodu powikłań pogrypowych w okresie między pandemicznym, szczepienie przeciw grypie dopuszczono również do stosowania wśród kobiet będących w drugim trymestrze ciąży (7, 35). Ostatecznie w 2004 roku ACIP wydał rekomendacje do stosowania inaktywowanych szczepionek przez każdą kobietę ciężarną niezależnie od czasu trwania ciąży (23).

SKUTECZNOŚĆ SZCZEPIEŃ KOBIECI CIĘŻARNYCH W KONTEKŚCIE STOSOWANYCH ZALECEŃ

Brak jest szczepionek zarejestrowanych ze specjalnym przeznaczeniem dla kobiet ciężarnych, ponieważ brak jest badań klinicznych przeprowadzonych na dużą skalę na grupie kobiet będących w ciąży. Z reguły zalecenia do ich stosowania oparte są jedynie na ocenie korzyści wynikającej z ich stosowania, w większości przypadków przeważającej nad ryzykiem podania szczepionki. Z powodu obaw o możliwą szkodę dla płodu, kobiety w ciąży są grupą wyłączoną z badań klinicznych, a jedynym dowodem bezpieczeństwa są badania obserwacyjne przeprowadzone na szczepionkach już wprowadzonych do obrotu. Jedyną szczepionką, której badania kliniczne przeprowadzone były wśród kobiet ciężarnych i obejmowały badania przeprowadzone na szeroką, światową skalę jest inaktywowana szczepionka przeciwko grypie (10, 11, 12, 21).

Korzyści związane ze szczepieniem kobiet ciężarnych są większe niż potencjalne ryzyko teoretycznie z nimi związane. Za bezpieczne do stosowania w czasie ciąży uważa się szczepionki zawierające toksoidy, inaktywowane szczepionki przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe oraz szczepionki zawierające oczyszczone antygeny drobnoustrojów. Ponieważ, istnieje potencjalne ryzyko poronienia lub wystąpienia wad wrodzonych płodu po podaniu szczepionek zawierających żywe drobnoustroje, są one w ciąży przeciwwskazane. Nie mniej jednak, brak jest dowodów potwierdzających ryzyko związane z podaniem szczepionek zawierających żywe patogeny. Bezpieczeństwo szczepionek zawierających żywe patogeny potwierdzone zostało w kilku badaniach klinicznych, przeprowadzonych po nieświadomym podaniu szczepionek kobietom ciężarnym (16, 31, 40, 48).

W 2003 roku Stany Zjednoczone zgodnie z Narodowym Programem Szczepień Ochronnych, zapoczątkowały szczepienie przeciw ospie prawdziwej wśród wszystkich osób zatrudnionych dla wojska w celu ochrony przed potencjalnym wykorzystaniem wirusa ospy prawdziwej jako broni biologicznej (41). Szczepionkę przeciwko ospie prawdziwej przez prawie pół wieku otrzymało ponad miliard osób na całym świecie, dlatego też jej skuteczność, bezpieczeństwo oraz rekomendacje do szczepień są bardzo dobrze udokumentowane (18). Jedyne dane, dotyczące przeniesienia żywego wirusa ospy prawdziwej na płód, związane są z obserwacją około 50 przypadków płodowej krowianki (33), z czego 3 opisane zostały w Stanach Zjednoczonych (25). Mimo to, badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych na grupie 376 kobiet zaszczepionych przeciw ospie prawdziwej w pobliżu chwili poczęcia lub tuż po poczęciu (zanim wynik testu ciążowego był pozytywny) nie potwierdzają, by podanie żywej szczepionki przeciwko ospie prawdziwej kobiecie ciężarnej mogło się wiązać z ryzykiem uszkodzenia płodu. Wyniki badania nie wykazały

wyższego niż oczekiwano ryzyka: utraty ciąży (11,9%), przedwczesnego porodu (10,7%) lub wad wrodzonych płodu (w tym niskiej masy urodzeniowej) (2,8%), w porównaniu z populacją kobiet nie poddanych szczepieniu (41). Nie odnotowano żadnego przypadku płodowej krowianki, mimo powszechnych opinii, że zwiększone ryzyko jej wystąpienia istnieje (32, 44).

Podobnie nie zaobserwowano przypadku zespołu wrodzonej ospy wietrznej ani zwiększonego ryzyka występowania wad wrodzonych u dzieci matek zaszczepionych w ciąży przeciw ospie wietrznej (48). Jednak mały zakres przeprowadzonych badań nie pozwala na wykluczenie takiego ryzyka (46).

W związku z potwierdzeniem możliwości przechodzenia wirusa różyczki przez barierę pępowinową, związanym z wykryciem przeciwciał klasy IgM w krwi pępowinowej (24), częstość występowania różyczki wrodzonej u dzieci matek poddanych przypadkowemu szczepieniu przeciw różyczce badano w wielu krajach (1, 19). Badanie przeprowadzone w Iranie na grupie 117 kobiet, nie dostarczyło dowodów na występowanie różyczki wrodzonej u dzieci w ciągu 6 miesięcznego okresu obserwacji (38). W badaniach przeprowadzonych na terenie obydwu Ameryk, wśród ponad 3500 kobiet poddanych działaniu wirusa różyczki na krótko przed lub we wczesnych etapach ciąży wykazano, iż możliwość przeniesienia wirusa na płód nie ma znaczenia klinicznego, ponieważ nie stwierdzono żadnego przypadku różyczki wrodzonej (4). Podobne wnioski płyną z badań przeprowadzonych na kobietach ciężarnych, które otrzymały poliwalentną szczepionkę przeciw odrze, śwince i różyczce. Nie wykazano występowania wad wrodzonych u dzieci, mogących wiązać się z zakażeniem wywołanym przez wirusy zawarte w szczepionkach, mimo możliwości ich przenikania przez łożysko (50).

Doustna szczepionka przeciwko polio (OPV), zawierająca żywe atenuowane szczepy wirusa polio typu 1, 2 i 3, stosowana jest w celu ochrony kobiet w ciąży i noworodków w wielu krajach od 1960 roku. Możliwość rozwoju wirerii po szczepieniu oraz przypadek śmiertelnego uszkodzenia neuronów rdzenia kręgowego u dziecka matki immunizowanej OPV zaobserwowano w badaniu przeprowadzonym w 1980 roku (2). Nie mniej jednak masowe programy szczepień w populacji częściowo uodpornionych, obejmujące również tysiące kobiet w ciąży, związane z epidemią wirusa polio m.in. w Finlandii (22) czy w Izraelu (29) nie wykazały żadnego związku między immunizacją matki szczepionką OPV, a występowaniem wad wrodzonych u ich dzieci. W związku z epidemią wirusa polio typu 3 jaka wybuchła jesienią 1984 roku w Finlandii, na początku 1985 roku szczepionkę OPV podano 94% całej populacji fińskiej, w tym kobietom w ciąży. Według danych Fińskiego Krajowego Rejestru Wad Wrodzonych wśród 6500 dzieci urodzonych z anomaliami w latach 1982 – 1986 nie zaobserwowano większej niż wcześniej liczby wad wrodzonych noworodków narażonych na działanie wirusa ze szczepionki OPV, a liczba zgonów okołoporodowych oraz dzieci urodzonych przedwcześnie w tamtym okresie czasu również nie odbiegała od dotychczasowych. Podobna epidemia związana z rozprzestrzenieniem się wirusa polio typu 3 wybuchła w 1988 roku w Izraelu. 90% populacji zostało zaszczepione szczepionką zawierającą żywy wirus polio. Odpowiednio, porównując występowanie wad wrodzonych u dzieci oraz powikłań ciążowych u kobiet z okresu przed epidemią (15 021 żywych urodzeń) i tuż po epidemii (15 696), nie wykazano różnic istotnych statystycznie (29). Szczepienia kobiet w ciąży w rejonach endemicznych, gdzie ryzyko zachorowania z powodu cyrkulacji dzikiego typu wirusa polio w środowisku jest wciąż duże, jest bardzo zasadne.

Mimo wielu pozytywnych badań ekspozycji kobiet ciężarnych na żywy patogen zawarty w szczepionkach Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), Światowy Komitet Doradczy ds. Bezpieczeństwa Szczepień WHO (Global Advisory Committee on Vaccine Safety – GACVS), Komitet ds. Ludzkich Produktów Leczniczych (CHMP) Europejskiej Agencji Leków (EMA) w swoich opiniach i zaleceniach utrzymują dotychczasowe przeciwwskazania do szczepienia przeciw odrze, śwince, różyczce i ospie wietrznej u kobiet w ciąży, ale podkreślają, że przypadkowe zaszczepienie kobiety w ciąży nie powinno być przyczyną przerwania ciąży, a podanie tych szczepionek kobiecie w okresie planowania ciąży zawsze powinno być związane z koniecznością zabezpieczenia się przed ciążą na okres co najmniej 1 miesiąca zamiast dotychczas obowiązującego okresu 3 miesięcy (26, 27, 47).

Wiele organizacji międzynarodowych m.in. ACIP oraz Amerykańskie Towarzystwo Położnictwa i Ginekologii – ACOG, biorąc pod uwagę niskie ryzyko zagrożeń wynikające ze szczepień dla matki, płodu i noworodka oraz korzyści jakie płyną z ochrony matki i noworodka rekomenduje szczepienia w czasie ciąży (8, 9, 14, 15). ACIP w ogólnych zaleceniach do szczepień dla kobiet ciężarnych oraz karmiących piersią (Recommendations for vaccination during pregnancy and breastfeeding) rekomenduje do rutynowego stosowania przez kobiety ciężarne szczepień przeciw:

- grypie (w okresie występowania zachorowań na grypę bez względu na czas trwania ciąży);
- tężcowi, najlepiej w skojarzeniu z toksoidem błoniczym i antygenem krztuścowym, (zaleca się stosowanie szczepionki Tdap kobietom będącym w 27-36 tygodniu ciąży bez względu na historię wcześniejszych szczepień w wywiadzie oraz liczbę ciąż).

Do stosowania w szczególnych przypadkach zaleca szczepienia przeciw:

- wąglikowi (tylko i wyłącznie poekspozycyjnie);
- wzw typu A (w przypadku narażenia na kontakt z patogenem);
- wzv typu B (w przypadku kontynuowania cyklu szczepień, dużego ryzyka cesarskiego cięcia u kobiety nieuodpornionej lub poekspozycyjnie – w przypadku dużego ryzyka rozwoju przewlekłego zakażenia HBV u noworodka);
- japońskiemu zapaleniu mózgu (w przypadku bezwzględnej konieczności podróżowania w rejonu endemicznego występowania patogenu);
- meningokokom (kiedy jest konieczne);
- polio szczepionką zawierającą inaktywowany wirus IPV (w przypadku bezwzględnej konieczności podróżowania w rejonu endemicznego występowania patogenu);
- pneumokokom szczepionką polisacharydową (kiedy jest konieczne);
- wścieklicznie (poekspozycyjnie, w przypadku bardzo dużego narażenia na kontakt z wirusem dopuszczalna jest profilaktyka preekspozycyjna);
- ospie prawdziwej (tylko i wyłącznie poekspozycyjnie);
- wirusowi żółtej gorączki (w przypadku bezwzględnej konieczności podróżowania w rejonu endemicznego występowania patogenu).

Brak jest wskazań do stosowania szczepionek przeciw:

- *Haemophilus influenzae* typu B;
- pneumokokom szczepionką skoniugowaną;
- durowi brzuszemu.

Szczepionkę przeciw durowi brzuszemu zaleca się kobietom planującym ciążę, a podróżującym w rejony endemicznego występowania bakterii *Salmonella enterica* serotyp Typhi.

Nie zaleca się szczepienia w okresie ciąży przeciw:

- wąglikowi (preekspozycyjnie);
- gruźlicy – szczepionką BCG;
- wirusowi brodawczaka ludzkiego – szczepionką przeciw HPV;
- grypie - szczepionką zawierającą żywy wirus (LAIV);
- odrze, śwince różyczce - szczepionką MMR;
- ospie prawdziwej;
- ospie wietrznej oraz półpaścowi.

ACIP nie zaleca stosowania u ciężarnych kobiet szczepionki przeciw wirusowi brodawczaka ludzkiego z powodu braku bezpośredniej korzyści dla kobiety w ciąży i jej dziecka. Jednak dane z badań klinicznych poprzedzających rejestrację, dotyczące przypadkowego narażenia kobiety ciężarnej na wirus szczepionkowy HPV są uspokajające (34).

Adsorbowana szczepionka przeciw wąglikowi (AVA) jest w chwili obecnej zarejestrowana do stosowania wyłącznie w Stanach Zjednoczonych, w celu profilaktyki pre- lub poekspozycyjnej na patogen. U kobiet, które dostały szczepionkę AVA w pierwszym tryestrze ciąży, występowało nieznacznie podwyższone ryzyko występowania wad wrodzonych u dzieci w porównaniu z kobietami, które otrzymały tę szczepionkę w późniejszym okresie ciąży. Jednakże wada jaką zaobserwowano u dziecka (ubytek przegrody międzyprzedsionkowej serca) najprawdopodobniej związana była z wcześniejszym niż planowano terminem przyjścia dziecka na świat, więc przypadek wyłączono z analizy. Ostatecznie ACIP stwierdził, że podanie szczepionki AVA nie jest związane ze zwiększonym ryzykiem wad wrodzonych u dziecka i może być stosowane w okresie ciąży, ale wyłącznie w przypadku realnego narażenia na kontakt z patogenem (42).

Pomimo dowodów możliwości przeniknięcia wirusa żółtej gorączki przez łożysko (43), dysponujemy danymi dotyczącymi użycia szczepionki przeciw żółtej gorączce (YF) podczas ciąży. Badania przeprowadzone wśród 1381 kobiet włączonych nie dostarczyły podstaw do podejrzenia zwiększonego ryzyka powikłań (45). Niemniej jednak biorąc pod uwagę, że szczepionka YF jest żywą szczepionką i że dostępne dane są ograniczone, ACIP zaleca szczepienie w ciąży jedynie w przypadku kiedy podróż w rejony endemiczne jest nieunikniona, a ryzyko zachorowania przewyższa potencjalne ryzyko związane z przeniesieniem wirusa szczepionkowego na płód. Podobnie jak w zaleceniach dotyczących większości innych żywych szczepionek, po podaniu szczepionki przeciw żółtej gorączce należy odczekać 4 tygodnie z zejściem w ciążę (43).

Przeprowadzone badania wykazały bezpieczeństwo szczepienia kobiet ciężarnych polisacharydową szczepionką przeciw pneumokokom i dowiodły jej skuteczność w ograniczeniu kolonizacji nosa bakteriami z gatunku *Streptococcus pneumoniae*. We krwi noworodków matek szczepionych w ciąży, zaobserwowano zwiększony poziom przeciwciał klasy IgG wobec szczepionkowych serotypów pneumokoków (17).

Bezpieczeństwo stosowania szczepionek przeciw meningokokom (zarówno polisacharydowych i skoniugowanych) zostało udowodnione w badaniach przeprowadzonych na 226 kobietach ciężarnych, które otrzymały dwuwalentną szczepionkę zawierającą serotypy A, C oraz na grupie 109 kobiet w ciąży, które otrzymały czterowalentną szczepionkę

zawierającą serotypy A, C, Y oraz W-135. Zaobserwowano przenikanie przeciwciał z krwi matki do płodu oraz brak zwiększonego ryzyka powikłań ciążyowych (30, 37).

Według ACIP, wiele szczepionek może być stosowanych w sytuacjach, w których korzyści dla kobiety w ciąży i jej dziecka przewyższają potencjalne ryzyko związane z podaniem szczepionki, ponieważ brak jest bezpośrednich dowodów na szkodliwość szczepionek. W przypadku prawie wszystkich szczepionek, które są dozwolone przez ACIP w pewnych okolicznościach, informacje na temat bezpieczeństwa ich stosowania u kobiet w ciąży są ograniczone, ale dostępne wyniki oparte na niewielkiej liczbie badań są pozytywne (30).

W Polsce w Programie Szczepień Ochronnych wśród szczepień zalecanych kobietom ciężarnym oraz planującym ciążę znajduje się inaktywowana szczepionka przeciwko grypie sezonowej oraz szczepionka przeciw błonicy, tężcowi i krztuścowi (do stosowania po 28 tygodniu ciąży).

Pomimo wielu uznanych zalet szczepienia kobiet w ciąży, obawy związane z brakiem dużej ilości badań nad bezpieczeństwem prowadzą do wstrzymywania się wielu kobiet w ciąży od szczepień. Jak sugerują pierwsze przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych badania mające na celu oszacowanie częstości stosowania szczepionek u kobiet ciężarnych (141 389 dawek szczepionek na 669 695 ciąż) (32) kobiety ciężarne otrzymują różne szczepionki w czasie ciąży. Najczęściej otrzymywaną szczepionką przez kobiety ciężarne była trójwartelna, inaktywowana szczepionka przeciw grypie (TIV) 174,1 dawek szczepionki na 1000 ciężarnych. Kolejnymi pod względem częstości podawania były szczepionki zawierające w swoim składzie: Tdap (6,34/1000) oraz Td (6,07/1000). Ważne jest, aby zaznaczyć, że w okresie objętym badaniem, ACIP zalecał szczepienie Tdap oraz Td tylko podczas specjalnych wskazań, natomiast w czerwcu 2011 roku zmienił zalecenia dla stosowania szczepionki Tdap w czasie ciąży do stosowania po 20 tygodniu ciąży lub w okresie poporodowym dla wszystkich kobiet, które nie były wcześniej szczepione Tdap lub nie miały szczepienia przypominającego szczepionką Td w ciągu ostatnich 10 lat (9, 14). Od października 2012 roku ACIP zaleca szczepienia Tdap dla wszystkich kobiet ciężarnych, niezależnie od poprzedniego szczepienia Tdap, a optymalny czas zaszczepienia rekomenduje między 27 a 36 tygodniem ciąży. Kolejną szczepionką wśród częstości podawania była szczepionka przeciw wzv B (3,73/1000). Częstość stosowania szczepionek zawierających żywe drobnoustroje była zdecydowanie niższa i wynosiła: dla szczepionki MMR 1,2 na 1000 ciąż, dla szczepionki przeciw ospie wietrznej 1.0/1000, a dla szczepionki przeciwgruźliczej BCG 0,01/1000 ciąż. Wyniki otrzymane przez autorów badania (32) są zgodne z wynikami kilku innych badań populacyjnych, potwierdzających, że poziom zaszczepienia przeciw grypie znacznie wzrósł po 2009 roku, kiedy miała miejsce pandemia grypy H1N1 z 10% - 33% (21) do 50% w 2010 i 2011 roku (10).

CELE NA PRZYSZŁOŚĆ

Wcześniejsze dyskusje dotyczące stosowania szczepionek w czasie ciąży, koncentrowały się tylko na potencjalnym ryzyku jakie może przynieść szczepienie, a nie na ich korzyści. W ciągu kilku ostatnich lat, zgromadzono wiele danych wskazujących na korzyści wiążące się ze szczepieniem kobiet ciężarnych oraz na brak zwiększonego ryzyka związanego z podaniem szczepionki. Nie mniej jednak, liczba kobiet planujących ciążę lub

będących w ciąży, poddających się szczepieniu wciąż jest niska. Wiele obszarów zdrowia publicznego, w celu zachęcenia kobiet ciężarnych do masowych szczepień, wymaga poprawy. Wśród najważniejszych należy wymienić:

- poprawę edukacji w zakresie szczepień ochronnych, w tym zmianę opinii, że szczepienia szkodzą,
- wprowadzenie niektórych szczepionek do kalendarza szczepień jako obowiązkowe, a nie tylko jako zalecane, poprzez znalezienie odpowiednich źródeł finansowania rutynowej opieki prenatalnej,
- poprawienie logistyki systemów opieki zdrowia, w celu większego nadzoru nad dokumentacją kobiet szczepiących się w ciąży,
- włączenie kobiet ciężarnych do badań klinicznych poprzedzających rejestrację szczepionek, które mogą być stosowane w czasie ciąży (więcej badań bezpieczeństwa oraz skuteczności),
- identyfikację nowych szczepionek, ze specjalnym przeznaczeniem dla kobiet ciężarnych, mających chronić przed chorobami o dużej zachorowalności i śmiertelności niemowląt.

Podsumowując, największe korzyści szczepienia kobiet w ciąży wykazano dla inaktywowanych szczepionek przeciw grypie oraz szczepionek zawierających toksoid tężcowy. Strategia ta została rozszerzona na krztusiec i wszystkie dotychczasowe dane pokazują, że jest bardzo korzystna, zwłaszcza dla niemowląt w pierwszych miesiącach ich życia. Wiele nowych danych dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności stosowania szczepionek w okresie ciąży dobrze rokuje na przyszłość.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bar-Oz B, Levichek Z, Moretti M* i inni. Pregnancy outcome following rubella vaccination: a prospective controlled study. *Am J Med Genet* 2004; 130A: 52–4.
2. *Burton A, Robinson E, Harper W* i inni. Fetal damage after accidental polio vaccination of an immune mother. *J R Coll Gen Pract* 1984; 34: 390–4.
3. *Burney L*. Influenza immunization: statement Public Health Rep 1960; 75: 944.
4. *Castillo-Solórzano C, Reef S, Morice A* i inni. Rubella vaccination of unknowingly pregnant women during mass campaigns for rubella and congenital rubella syndrome elimination, the Americas 2001–2008. *J Infect Dis* 2011; 204 (Suppl. 2): 713–7.
5. Centers for Disease Control and Prevention Prevention and control of influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1995; 44: 1–22.
6. Centers for Disease Prevention and Control Prevention and control of influenza. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1990; 39: 1–15.
7. Centers for Disease Prevention and Control Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1997; 46: 1–25.
8. Centers for Disease Control and Prevention. General recommendations on immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2011; 60: 26–27.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for vaccinating pregnant women from recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP, March 2012 version). www.cdc.gov/vaccines/pubs/downloads/b_preg_guide.pdf.

10. Centers for Disease Control and Prevention. Influenza vaccination coverage among pregnant women—United States, 2010–2011 influenza season MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2011; 60: 1078–82.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Receipt of influenza vaccine during pregnancy among women with live births—Georgia and Rhode Island, 2004–2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58: 972–5.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Seasonal influenza and 2009 H1N1 influenza vaccination coverage among pregnant women—10 states, 2009–2010 influenza season MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010; 59: 1541–5.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Ten great public health achievements – United States, 1900–1999. Morb Mortal Wkly Rep 1999; 48: 241–3.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women and persons who have or anticipate having close contact with an infant aged <12 months—Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2011, 60: 1424–6.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women—Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2013, 62: 131–5
16. *Cetron M, Marfin A, Julian K i inni*. Yellow fever vaccine recommendations of the ACIP, 2002. MMWR Recomm Rep 2002; 51: 1–10.
17. *Chaiithongwongwarthana S, Yamasmit W, Limpongsamurak S i inni*. Pneumococcal vaccination during pregnancy for preventing infant infection (Review). The Cochrane Collaboration 2015, published by John Wiley & Sons, Ltd., Issue 1.
18. *Cono J, Casey C, Bell D*. Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians. MMWR Recomm Rep 2003; 52: 1–28.
19. *Da Silva e Sa G, Camacho L, Stavola M i inni*. Pregnancy outcomes following rubella vaccination: a prospective study in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 2001–2002. J Infect Dis 2011, 204 (Suppl.2): 722–8.
20. *Demicheli V, Barale A, Rivetti A*. Vaccines for women to prevent neonatal tetanus. Cochrane Database Syst Rev 2013.
21. *Ding H, Santibanez T, Jamieson D i inni*. Influenza vaccination coverage among pregnant women—National 2009 H1N1 Flu Survey (NHFS). Am J Obstet Gynecol 2011; 204: 96–106.
22. *Harjulehto-Mervaala T, Aro T, Hiilesmaa V i inni*. Oral polio vaccination during pregnancy: no increase in the occurrence of congenital malformations. Am J Epidemiol 1993; 138: 407–4.
23. *Harper S, Fukuda K, Uyeki T i inni*. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) MMWR Recomm Rep 2004; 53: 1–40.
24. *Hofmann J, Kortung M, Pustowski B i inni*. Persistent fetal rubella vaccine virus infection following inadvertent vaccination during early pregnancy. J Med Virol 2000; 61: 155–8.
25. *Hood C, McKinnon G*. Prenatal vaccinia. Am J Obstet Gynecol 1963; 85: 238–40.
26. Global Advisory Committee on Vaccine Safety. Weekly epidemiological record, WHO 2012; 87: 281–7.
27. *Keller-Stanislawski B, Englund J, Kang G i inni*. Safety of immunization during pregnancy: A review of the evidence of selected inactivated and live attenuated vaccines. Vaccine 2014; 32: 7057–64.
28. *Kroger A, Atkinson W, Pickering L*. General immunization practices. W: Vaccines 6th edition, ed. By Plotkin S., Orenstein W.A., Offit P.A. Elsevier Saunders 2013; 105–6.
29. *Linder N, Handsher R, Fruman O i inni*. Effect of maternal immunization with oral poliovirus vaccine on neonatal immunity. Pediatr Infect Dis J 1994; 13: 959–62.
30. *Makris M, Polyzos K, Mavros M i inni*. Safety of hepatitis B, pneumococcal polysaccharide and meningococcal polysaccharide vaccines in pregnancy: a systematic review. Drug Saf 2012; 35: 1–14.

31. *Moro P, Broder K, Zheteyeva Y* i inni. Adverse events in pregnant women following administration of trivalent inactivated influenza vaccine and live attenuated influenza vaccine in the Vaccine Adverse Event Reporting System, 1990–2009. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: 146.
32. *Naleway A, Kurosky S, Henninger M* i inni. Vaccinations given during pregnancy, 2002–2009: a descriptive study. *Am J Prev Med* 2014; 46 :150–7.
33. *Napolitano P, Ryan M, Grabenstein J*. Pregnancy discovered after smallpox vaccination: is vaccination immune globulin appropriate? *Am J Obstet Gynecol* 2004, 191: 1863–7.
34. *Narducci A, Einarson A, Bozzo P*. Human papillomavirus vaccine and pregnancy. *Can Fam Physician* 2012; 58: 268–9.
35. *Neuzil K, Reed G, Mitchel E* i inni. Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 1094–102.
36. *Newell K, Duenas Lehmann A* i inni. The use of toxoid for the prevention of tetanus neonatorum. Final report of a double-blind controlled field trial. *Bull WHO* 1966; 35: 863–71.
37. *O'Dempsey T, McArdle T, Ceesay S* i inni. Meningococcal antibody titres in infants of women immunised with meningococcal polysaccharide vaccine during pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996; 74: 43–6.
38. *Pardon F, Vilariño M, Barbero P* i inni.. Rubella vaccination of unknowingly pregnant women during 2006 mass campaign in Argentina *J Infect Dis* 2011; 204 (Suppl. 2): S745–S747.
39. *Rasmussen S, Watson A, Kennedy E* i inni. Vaccines and pregnancy: Past, present, and future. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2014; 19: 3161–9.
40. *Ryan M, Gumbs G, Conlin A* i inni. Evaluation of preterm births and birth defects in live born infants of U.S. military women who received smallpox vaccine. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008; 82: 533–9.
41. *Ryan M, Seward J*. Pregnancy, birth, and infant health outcomes from the National Smallpox Vaccine in Pregnancy Registry, 2003–2006. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 221–6.
42. *Ryan M, Smith T, Sevick C* i inni. Birth defects among infants born to women who received anthrax vaccine in pregnancy. *Am J Epidemiol* 2008; 168: 434–2.
43. *Staples J, Gershman M, Fischer M*. Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) *MMWR Recomm Rep* 2010, 59: 1–27.
44. *Suarez V, Hankins G*. Smallpox and pregnancy: from eradicated disease to bioterrorist threat. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 87–93.
45. *Thomas E, Lorenzetti D, Spragins W* i inni. The safety of yellow fever vaccine 17D or 17DD in children, pregnant women, HIV+ individuals, and older persons: systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86: 359–72.
46. US Food and Drug Administration. List of pregnancy exposure registries v/ [scienceresearch/specialtopics/womenshealthresearch/ucm134848.html](http://www.fda.gov/scienceresearch/specialtopics/womenshealthresearch/ucm134848.html)
47. *Wharton M, Strikas R, Harpaz R* i inni. Recommendations for using smallpox vaccine in a pre-event vaccination program. Supplemental recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) *MMWR Recomm Rep* 2003; 52: 1-16
48. *Wilson E, Goss M, Marin M* i inni. Varicella vaccine exposure during pregnancy: data from 10 years of the pregnancy registry. *J Infect Dis* 2008; 197 (supl 2): 178–184.
49. World Health Organization. Maternal and Neonatal Tetanus (MNT) elimination http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/MNTE_initiative/en
50. *Wyll S, Hermann K*. Inadvertent rubella vaccination of pregnant women: fetal risk in 215 cases. *J Am Med Assoc* 1973, 225: 1472–6.

Otrzymano: 28 IX 2016 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Badań Surowic i Szczepionek 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).

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

2. Powtórna publikacja

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

II. Instrukcja dotycząca przygotowania artykułu.

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

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

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

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

W tekście artykułu 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). *Galązka 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.