Kwartalnik
Tom 52
Zeszyt 1•2013
STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:
PMKMAV 52 (1)
2013

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,52 (2012)
Impact Factor ISI = 0,151 (2012)
Punktacja MNiSW = 15,00 (2012)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka),
EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski),
WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków), MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), JERZY HREBENDA (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

ADRESY REDAKCJI

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 04, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl; j.hrebenda@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
tel./fax: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

Stali recenzenci:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
JÓZEF KUR (Politechnika Gdańska), EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Fonsecaea monophora – szczegóły morfologii (widoczny konidiofor i układ konidiów). SEM, pow. 4 000 x.
Autor zdjęcia: dr n. med. Tomasz Jagielski; Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 1150, Objętość 17 arkuszy wyd., Papier offset 90 g

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel. 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 3–4
http://www.pm.microbiology.pl

WSPOMNIENIE

Prof. dr hab. med. Felicja Meisel-Mikołajczyk (1927–2012)

Środowisko mikrobiologów z wielkim smutkiem przyjęło wiadomość, że w dniu 3 grudnia zmarła jedna z czołowych postaci polskiej mikrobiologii, prof. dr hab. med. Felicja Meisel-Mikołajczyk. Była jednym z pierwszych specjalistów mikrobiologii lekarskiej, wraz z ojcem, prof. Henrykiem Meislem stworzyła szkołę zajmującą się badaniami beztlenowców. Mikrobiologia, chyba tylko poza ukochaną rodziną, była jej największą miłością. Śledząc losy prof. Felicji Meisel-Mikołajczyk, trudno się temu dziwić, jako że praktycznie całe jej życie obracało się wokół mikrobiologii. Z mikrobiologią związani byli zarówno rodzice, jak również jej mąż.

Prof. Felicja Meisel-Mikołajczyk urodziła się 15 marca 1927 roku, w Jarosławiu (obecnie woj. podkarpackie). Szkołę powszechną ukończyła w 1939 r. we Lwowie, i tam rozpoczęła naukę w szkole średniej. We Lwowie pracowali rodzice prof. Felicji Meisel-Mikołajczyk, obydwoje byli lekarzami. Pracowali początkowo w tamtejszym Państwowym Zakładzie Higieny, a później w czasie okupacji sowieckiej w Instytucie prof. Rudolfa Weigla. Niestety edukację szkolną prof. Felicji Meisel-Mikołajczyk przerwało wkroczenie Niemców, kiedy to jej rodzice zostali aresztowani i wywiezieni do Oświęcimia, a ona była zmuszono do ukrywania się u przyjaciół. W tym czasie kontynuowała naukę w domu. Lwów opuściła w 1945 roku i przeniosła się wraz ze szczęśliwie ocalonymi rodzicami do Łodzi, gdzie tymczasowo rozpoczął działalność Państwowy Zakład Higieny. Tam rodzice prof. Felicji Meisel-Mikołajczyk rozpoczęli pracę. Również w Łodzi, w 1946 zdała maturę w liceum dla dorosłych i została przyjęta na Wydział Lekarski Uniwersytetu Łódzkiego. Ponieważ w 1947 roku PZH, po remoncie budynków wrócił do Warszawy, do Warszawy przeniosła się cała rodzina prof. Felicji Meisel-Mikołajczyk i tu osiedli na stałe. W 1951 roku wyszła za mąż, również za lekarza-mikrobiologa, dr Edwarda Mikołajczyka, również pracującego w PZH. Z mężem przeżyła w udanym związku wiele lat (do jego śmierci w 1988 oku). Dochowali się dwóch synów, przebywających obecnie na stałe za granicą oraz licznych wnuków.

Prof. Felicja Meisel-Mikołajczyk uzyskała dyplom Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie w roku 1952, ale jeszcze przed uzyskaniem dyplomu,

w roku 1951 podjęła pracę w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej na swojej uczelni, kierowanym wówczas przez prof. Edmunda Mikulaszka. W tym samym zakładzie pracowała aż do osiągnięcia wieku emerytalnego w 1997 roku. Zajmowała kolejno stanowiska: asystenta, adiunkta, profesora nadzwyczajnego i profesora zwyczajnego. Od 1992 roku aż do emerytury, na którą przeszła w1997 roku, była Kierownikiem Zakładu, a w latach 1990–1993 była Prodziekanem i Kierownikiem Studiów Doktoranckich II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego). Stopień docenta uzyskała w 1967 roku, a tytuł profesora w 1985.

Prof. Felicja Meisel-Mikołajczyk większość swojej pracy naukowej poświęciła beztlenowcom. Pierwsze jej prace dotyczyły głównie *Clostridium perfringens*. Interesowała się budową antygenową form wegetatywnych i przetrwalników tych bakterii. W latach 70-tych włączyła do swoich badań beztlenowce nieprzetrwalnikujące, przede wszystkim pałeczki Gram-ujemne. Również w tym przypadku jej prace miały charakter

immunochemiczny i skupiały sie głównie na otrzymywaniu, oczyszczaniu i badaniu endotoksyn tych pałeczek. W latach 80-tych skupiła się szczególnie na badaniu *Bacteroides fragilis* i była autorką wielu nowatorskich, jak na owe czasy prac. Wraz ze współpracownikami opracowała między innymi metodę immunofluorescencji bezpośredniej służącą do różnicowania pałeczek *Bacteroides* z ówczesnej grupy fragilis. W badaniach na zwierzętach wykazała możliwość negatywnego oddziaływania endotoksyn *Bacteroides fragilis* na rozwój płodu, w przypadku zakażenia wód płodowych. Zawsze fascynowała ja również naturalna flora jelita człowieka i zwierząt, jako, że trzon tej flory stanowią właśnie beztlenowce. Jako pierwsza w Polsce zajęła sie tak szeroko obecnie badanym drobnoustrojem, jakim jest *Clostridium difficile.* Już w ubiegłym stuleciu propagowała stosowanie w ciężkich przypadkach *colitis pseudomembranacea*, zagrażających życiu, transplantacji kału od zdrowego członka rodziny. Jest to metoda, która początkowo odrzucana ze względu na liczne niedogodności oraz niebezpieczeństwo przeniesienia różnych zakażeń, obecnie w dobie kryzysu antybiotykowego zdobywa, co raz większą popularność, jako metoda łatwa, tania i po zastosowaniu której występuje znacznie mniej nawrotów niż po terapii antybiotykowej. Ostatnie prace prof. Felicji Meisel-Mikołajczyk, dotyczyły właśnie *C. difficile*, wykonała we współpracy z ośrodkami w Holandii pierwsze rybotypowanie szczepów występujących w Polsce, zajmowała sie metodami wykrywania toksyn tego drobnoustroju (stworzyła jedyny w Polsce ośrodek gdzie stosowano do wykrywania toksyn hodowle komórkowe). Ona zapoczątkowała badania, w których sugerowała udział w biegunkach poantybiotykowych również *C. perfringens.* Jej badania dotyczyły również *B. fragilis*, były to pionierskie badania wskazujące na rolę w patogenezie zakażeń powodowanych przez ten drobnoustrój również specyficznej enterotoksyny.

Prof. Felicja Meisel-Mikołajczyk współpracowała z wieloma ośrodkami w Polsce i za granicą, czego owocem były wspólne publikacje. Było ich ponad 180, w czasopismach krajowych i zagranicznych, często o wysokim IF. Jej prace były licznie cytowane. Była wielokrotnie nagradzana przez JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu medycznego nagrodami dydaktycznymi, organizacyjnymi i naukowymi, a także odznaczona Złotym Krzyżem Zasługi w 1974 i Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski w 1983 r. Wykształciła całe pokolenia mikrobiologów. Była promotorem doktoratów, opiekunem specjalizacji, pod jej bezpośrednim lub pośrednim kierunkiem powstawały prace habilitacyjne. Do Jej grona wychowanków należy również moja skromna osoba, jako że właśnie pod jej kierunkiem rozpoczynałam swoją pracę mikrobiologa. Mimo, że później nasze drogi naukowe się rozeszły, to być może poprzez częsty kontakt i dyskusje, zaszczepione przez Prof. Felicję Meisel-Mikołajczyk zainteresowanie beztlenowcami pozostawało wciąż żywe. Przez wiele lat pracowałyśmy z Prof. Felicją Meisel-Mikołajczyk w tym samym Zakładzie i przez ten czas poznałam ją, jako osobę o silnym charakterze, bardzo aktywną, pełną optymizmu i wiary w ludzi. Wyczulona na krzywdę zawsze chętnie służyła pomocą, wręcz „matkowała" niektórym swoim współpracownikom. Będąc już na emeryturze, jeszcze przez wiele lat codziennie była obecna w Swoim Zakładzie, który traktowała jak drugi dom. Kierowała rozpoczętymi wcześniej tematami naukowymi, prowadziła doktorantów, pisała prace. Z czasem niestety sił ubywało i co raz trudniej było Pani Profesor wspiąć się na wysokie piętro, co jest konieczne, aby dostać się do Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej. Starała się jednak uczestniczyć, chociaż w posiedzeniach naukowych. Była tez stałym uczestnikiem posiedzeń Warszawskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Już w czasie ciężkiej choroby, w rozmowach telefonicznych jej pierwsze pytanie zawsze dotyczyło Zakładu.

Razem z nią odeszło ponad pół wieku historii polskiej mikrobiologii, którą Pani Profesor Felicja Meisel-Mikołajczyk aktywnie tworzyła i pozostanie w niej na zawsze ważną postacią. Cześć jej pamięci!

Prof. dr hab. n. med. Grażyna Młynarczyk
Kierownik Katedry
i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 5–7
http://www.pm.microbiology.pl

WSPOMNIENIE

Prof. dr hab. med. Mieczysław Janowiec (1921–2012)

1964 r. foto Z. Zwolska

Prof. dr hab.med. **Mieczysław Janowiec** – urodził się 5 września w 1921 r. w Rabce.

Pochodził z bardzo znanej na Podhalu rodziny z tradycjami patriotycznymi. Ojciec Jego – Andrzej pracował jako miejski lekarz weterynarii w Rabce. W randze porucznika brał udział w I wojnie światowej, walcząc we Włoszech. Wywieziony w czasie II wojny razem z innymi Polakami do Starobielska (więzień nr 3914), w 1940 r. został zamordowany. Po stracie ojca wychowywał się pod opieką matki Heleny, nauczycielki w szkołach w Rabce. Starszy brat Mieczysława – Stanisław, student Politechniki Warszawskiej zginął w 1944 r. w Powstaniu Warszawskim , pośmiertnie został odznaczony za waleczność. Młodszy brat – Jerzy jest architektem i prowadzi kroniki rodzinne, dokumentując dzieje wielu pokoleń rodziny Janowców wywodzących się z Podhala. Na cmentarzu w Rabce-Zaryte znajduje się symboliczny grób dra Andrzeja Janowca, miejsce, które często odwiedzają Rabczanie.

Szkołę podstawową ukończył w Rabce, gimnazjum i liceum w Krakowie, gdzie w 1939 r. otrzymał świadectwo dojrzałości. Wybuch wojny zastał Go na obozie junackim, obowiązkowym wtedy dla mężczyzn po otrzymaniu matury. Wojna była ciężkim doświadczeniem dla całej rodziny. Ojciec przebywał w obozie w Starobielsku, willa rodzinna „Słońce" zajęta została przez Niemców, młody Mieczysław pracował jako robotnik na utrzymanie swoje, matki i młodszego brata.

W 1945 r. wstąpił na Wydział Lekarski UJ w Krakowie. W 1949 uzyskał absolutorium, a rok później dyplom lekarza. Wkrótce otrzymał etat asystenta w Zakładzie Mikrobiologii Śląskiej AM w Rokitnicy prowadzonym przez prof. St. Ślopka. W 3 lata później, w wieku 30 lat (1951 r.) obronił doktorat z dziedziny mikrobiologii gruźlicy na podstawie dystertacji: O hodowli prątków gruźlicy metodą szkiełkową i jej przydatności do celów rozpoznawczych. Po otrzymaniu stanowiska adiunkta oprócz pracy naukowej i dydaktycznej zajmował się pracami administracyjnymi i reorganizacją Zakładu Mikrobiologii. Pierwsza nagrodę MZiOS otrzymał w wieku 31 lat, później był wielokrotnie nagradzany i wyróżniany. Równoległe z pracą w Zakładzie Mikrobiologii przez 4 lata był zatrudniony w szpitalu Klinicznym w Zabrzu. W 1954 r. dr. M. Janowiec uzyskał specjalizację z zakresu mikrobiologii i otrzymał stanowisko adiunkta. W styczniu 1955 r. został przeniesiony służbowo do Instytutu Gruźlicy w Warszawie i rozpoczął pracę jako adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii pracując równolegle w Zakładzie Antybiotyków PZH, a potem w Zakładzie Farmakologii Instytutu Leków jako kierownik i główny organizator Samodzielnej Pracowni Doświadczalnej. W 1961 r. uzyskał tytuł docenta na podstawie pracy habilitacyjnej pt.: Odczyn hemaglutynacyjny w diagnostyce i badaniach odporności w gruźlicy . Recenzentami jego pracy byli profesorowie: E. Mikulaszek, Wł. Kuryłowicz i St. Ślopek. Do końca czynnej pracy zawodowej główne jego zainteresowania skupiały się wokół prątków. Wkrótce jako samodzielny pracownik naukowy został kierownikiem Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy. W 52 roku życia uzyskał tytuł profesora.

Od 1973 r. do 1991 przez 18 lat pełnił funkcję Kierownika Zakładu Mikrobiologii.

Prowadził szeroką działalność dydaktyczną. Działał w Towarzystwach Naukowych, przez kilkanaście lat pełnił funkcję sekretarza Fundacji im. Jakuba hr. Potockiego, która promowała młodych naukowców pracujących w dziecinie gruźlicy i onkologii przyznając im stypendia pieniężne na kształcenie w Europie Zachodniej. W książce poświęconej działalności Fundacji Prof. M. Janowiec opisał tę działalność.

2002 r. trzy pokolenia Kierowników Zakładu Mikrobiologii
foto Z. Zwolska

Profesor Janowiec pełnił liczne oficjalne funkcje w Instytucie Gruźlicy, później przemianowanym na Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc zajmując różne stanowiska i pełniąc zaszczytne funkcje społeczne: wice Dyrektora ds. Nauki w latach 1969 do 1977 r., zastępcy specjalisty krajowego ds. nadzoru w pionie ftizjopneumonologicznym, członka Rady Naukowej, Przewodniczącego Sekcji Mikrobiologii przy Radzie Naukowej IGiCHP, członka Rad Redakcyjnych Pneumonologii Polskiej, Diagnostyki Laboratoryjnej i innych czasopism. Był członkiem wielu Towarzystw Naukowych. Był nauczycielem; opiekował się doktorantami, habilitantami, oraz kolegami specjalizującymi się w mikrobiologii klinicznej. Na Jego dorobek naukowy składają się 422 publikacje oryginalne, redakcje 3 książek o mikrobiologii i serologii, jest autorem podręcznika pt.: Mikrobiologia gruźlicy, autorem wielu rozdziałów w podręcznikach klinicznych, autorem i redaktorem skryptu Mikrobiologia Gruźlicy, który doczekał się wielu wydań. Jest współautorem wielu patentów, otrzymał liczne nagrody od Ministra Zdrowia i Dyrektorów Instytutów w których pracował. Przez wiele lat ściśle współpracował z Instytutem Gruźlicy w Berlin-Buch rozwijając prace nad biochemią prątka gruźlicy. Organizował konferencje polsko-niemieckie, a wyniki Jego badań były publikowane w czasopismach zagranicznych.

Profesor M. Janowiec przez wiele lat zajmował się prątkami atypowymi. Stworzył algorytm typowania, poszukiwał prątków w środowisku człowieka: w ziemi, próbkach wody, w ściekach, a nawet w ziemi pobranej ze Szpitzbergenu. Współpracował w tym temacie z wieloma ośrodkami europejskimi.

Innym Jego zainteresowaniem naukowym była chemioterapia doświadczalna. Pracował ze wszystkimi gatunkami zwierząt, badał efektywność leków i reżimów leczenia skojarzonego, zajmował się wpływem różnych czynników na rozwój gruźlicy u zwierząt np. pylicy. Badał zjawisko powstawania lekooporności u prątków gruźlicy. Opracowywał różne drogi zakażania gruźlicą zwierząt doświadczalnych np. dospojówkowa, dotchawicza, dożylna. Sam konstruował aparaty, które umożliwiały modelowe badania. Czasami do tych aparatów używał dziwnych (jak na obecne czasy) materiałów: pleksiglasu, metalowych elementów rur np. od odkurzacza. Przygotowywał rysunki prototypów, według których rzemieślnicy wykonywali aparaty metalowe lub szklane. Profesor uczył swoich asystentów jak pracować poprawnie i w sposób humanitarny ze zwierzętami. W tamtych, odległych latach, wprowadził w Zakładzie hodowlę prątków na żywych tkankach. W Zakładzie Mikrobiologii stały inkubatory, w których hodowało się zapłodnione jaja kurze, a zarodki zakażało prątkami.

Oprócz gruźlicy zajmował się również bakteriami szybkorosnącymi, głównie występującymi w drogach oddechowych, metodami diagnostyki trudnych do hodowli gatunków bakterii, wpływem antybiotyków i innych inhibitorów. Wszystkie swoje doświadczenia opisywał i publikował. Był inicjatorem wielu różnych działań, które w tamtych czasach nie zawsze były należycie docenione. Do najważniejszych działań organizacyjnych w gruźlicy należało zorganizowanie w latach 1960-tych sieci laboratoriów mikrobiologii prątka – jedno z najbardziej nowatorskich i postępowych działań (do dnia dzisiejszego) w programach walki z gruźlicą w świecie. W latach 70 było w Polsce ponad 200 laboratoriów prątka, a Pan Profesor znał każde z nich ,również osobiście kierownika i personel; sam wizytował dziesiątki laboratoriów każdego roku, prowadził sprawdziany jakości i wiarygodności pracy laboratoriów prątka. Wtedy to Zakład Mikrobiologii otrzymał od Ministra Zdrowia nominację na Laboratorium Referencyjne nadzorujące wszystkie laboratoria prątka w kraju. Taka sytuacja ma miejsce po dzień dzisiejszy.

Na zakończenie warto wspomnieć hobby Profesora Janowca, którym było fotografowanie. Utrwalał na zdjęciach bakterie, a szczególnie prątki, na pożywkach, pod mikroskopem, również elektronowym. Fotografował wszystkie ważniejsze wydarzenia naukowe i prywatne

2012 r. foto Z. Zwolska

rocznice kolegów, asystentów w Zakładzie. Sam zorganizował ciemnię fotograficzną, w której naświetlał i wywoływał filmy i robił odbitki. Czasem co prawda, trudno było się rozpoznać się na zdjęciu, ale w miarę rozwoju technik fotograficznych i możliwości zakupu lepszego aparatu jakość zdjęć wyraźnie się poprawiała.

Przejście na emeryturę nie oznaczało dla profesora zakończenia pracy. W dalszym ciągu prowadził w Zakładzie badania nad poszukiwaniem nowych leków przeciwprątkowych (temat kiedyś rozpoczęty z profesorami: J. Venuletem, J. Dalhingową T. Woźnicką), kontynuowany z prof. H. Foksem). Jako emerytowany Profesor opublikował wiele prac z tego zakresu.

W dniu 20 grudnia 2012 r. odszedł od nas po krótkiej chorobie Nasz Profesor. Odszedł człowiek dobrego serca i pełen życzliwości do ludzi, naukowiec, nauczyciel i wizjoner, prekursor badań naukowych w Polsce nad prątkami gruźlicy, człowiek, który przyczynił się do opanowania epidemii gruźlicy w kraju, w latach 1950-tych i 1960-tych. Mieliśmy szczęście obchodzić w grudniu 2011 r. razem z Nim, Jego rodziną, asystentami i kolegami uroczystość 90-lecia Profesora. Kontynuujemy i pomnażamy Jego dzieło wierząc, że jest to najlepszy dowód szacunku i pamięci dla naszego nauczyciela i przyjaciela. Pozostanie w naszej pamięci na wiele lat.

Prof. dr hab. Zofia Zwolska
z.zwolska@igichp.edu.pl

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 9–16
http://www.pm.microbiology.pl

MOLEKULARNE PODŁOŻE ODDZIAŁYWAŃ POMIĘDZY *BORRELIA BURGDORFERI*, KLESZCZEM I KRĘGOWCEM

Dominik Lewandowski[1], Anna Urbanowicz[1], Marek Figlerowicz[1]*

[1] Pracownia Biologii Molekularnej i Systemowej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. *Borrelia burgdorferi* – podstawowe informacje. 3. Kleszcz jako pasożyt. 4. Kolonizacja kleszcza przez *B. burgdorferi*. 5. Białka kleszcza wykorzystywane przez *B. burgdorferi* podczas zakażania organizmu gospodarza. 6. Podsumowanie

Molecular interactions between *Borrelia burgdorferi* ticks and mammals

Abstract: Over the last decade, the incidence of tick-borne diseases has been rapidly increasing in Poland. Lyme disease cases are especially frequent. They disease in caused by *Borrelia burgdorferi* spirochetes. The enzootic cycle of the Lyme disease pathogen involves both a mammalian host and an *Ixodes* tick vector. *B. burgdorferi* enters the tick during its feeding on an infected vertebrate. To survive in the vector and to enter the host, spirochetes utilize their lipoproteins anchored in the external bacterial membrane and tick-encoded proteins. *B. burgdorferi* is so well adapted to the vector that it is also capable of employing tick strategies to more effectively infect mammalian hosts.

Tick-*Borrelia* interaction is a very interesting and complex example of parasitism. Better understanding of the mechanisms underlying this phenomenon is indispensable for the development effective strategies of Lyme disease prophylactics and treatment. Here, we describe how *B. burgdorferi* alters gene expression depending on the tick or vertebrate environment. We also characterize the key bacterial and vector proteins necessary for spirochete for effective colonization of the tick.

1. Introduction. 2. *B. burgdorferi* characteristics. 3. Ticks as a parasites. 4. Tick colonization by *B. burgdorferi.* 5. Tick proteins exploited by *B. burgdorferi* during host infestation. 6. Summary

Słowa kluczowe: *B. burgdorferi*, białka powierzchniowe, borelioza, kleszcz
Key words: *B. burgdorferi*, outer-surface proteins, Lyme disease, tick

1. Wprowadzenie

Kleszcze to pasożyty zewnętrzne, żywiące się krwią wielu gatunków kręgowców. Podczas żerowania kleszcze mogą wprowadzić do organizmu gospodarza różne czynniki chorobotwórcze (bakterie, wirusy, pierwotniaki) wywołujące zoonozy np.: boreliozę, odkleszczowe zapalenie mózgu, tularemię, ehrlichiozę, babeszjozę, czy mykoplazmozę. W ciągu ostatniej dekady nastąpił w Polsce gwałtowny wzrost zapadalności na choroby odkleszczowe, a szczególnie na boreliozę wywoływaną przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato (s. l.)*. Krążenie *B. burgdorferi s. l.* w środowisku naturalnym zależy od obecności właściwych wektorów oraz nosicieli. W Polsce wektorem przenoszącym *B. burgdorferi s. l.* są kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W niektórych rejonach Polski do 50% kleszczy może być zakażonych *B. burgdorferi s. l.* [10, 11, 46].

Zachodzące w Europie zmiany klimatyczne i związane z nimi cieplejsze zimy oraz gorętsze i wilgotniejsze lata są jedną z przyczyn ciągłego poszerzania obszarów zasiedlanych przez kleszcze i zwiększania ich liczebności. Jako inne przyczyny wzrostu zapadalności na boreliozę wymienia się rozwój turystyki na terenach leśnych oraz obserwowany w ostatnich latach wzrost populacji dzikich zwierząt. Rozpatrując złożoność ekologicznych i epidemiologicznych uwarunkowań takich chorób jak borelioza, czy kleszczowe zapalenie mózgu, trudno jest jednoznacznie wskazać główną przyczynę ich rozprzestrzeniania. W związku ze wzrastającą liczbą zakażeń krętkami *B. burgdorferi s. l.*, także wśród ludzi, problem powstrzymania dalszej ekspansji tego groźnego patogenu staje się coraz bardziej naglący. Stworzenie skutecznych strategii profilaktyki i terapii boreliozy wymaga jednak lepszego poznania mechanizmów molekularnych procesów zachodzących podczas oddziaływań bakterii, kleszcza i jego gospodarza [5].

2. *Borrelia burgdorferi* – podstawowe informacje

Krętki z rodzaju *Borrelia* to Gram-ujemne bakterie o średnicy 0,3–0,5 μm i długości 20–30 μm. Obecnie znanych jest wiele gatunków należących do tego rodzaju (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bissettii, B. spielmanii, B. lusitaniae* i *B. valaisiana*). W Europie gatunki *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* traktowane są jako jeden czynnik chorobotwórczy nazywany *B. burgdorferi sensu lato (s. l.)* [16].

Krętki *B. burgdorferi* są przenoszone na ludzi głównie przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W Europie i Azji są to gatunki: *Ixodes ricinus* oraz *I. persulcatus*, w Ameryce

* Autor korespondencyjny: Pracownia Biologii Molekularnej i Systemowej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; e-mail: Marek.Figlerowicz@ibch.poznan.pl

Północnej: *I. scapularis*, a także *I. pacificus*. W Polsce wektorem przenoszącym *B. burgdorferi s. l.* jest *I. ricinus*. Krętki występują także u innych gatunków kleszczy, pewnych gatunków pcheł, much i komarów [36]. Wydaje się jednak, że te bezkręgowce nie przenoszą ich na ludzi. Największy rezerwuar bakterii *B. burgdorferi s. l.* stanowią drobne gryzonie, nieco mniejszy duże ssaki oraz ptaki [16, 46, 51]. Ludzie oraz zwierzęta domowe, u których rozwija się borelioza, są dla krętka przypadkowymi gospodarzami. Mimo iż wszystkie trzy stadia rozwojowe kleszczy mogą żywić się krwią człowieka, do zakażeń ludzi najczęściej dochodzi w wyniku kontaktu z nimfami, które są małymi i trudnymi do zauważenia, a przy tym najbardziej agresywnymi formami rozwojowymi kleszczy [10, 11, 46].

B. burgdorferi s. l. najczęściej zasiedla kleszcze w stadium larwy lub nimfy, podczas ich żerowania na zakażonym krętkiem kręgowcu. Bakteria nie przedostaje się z dorosłej samicy kleszcza na składane przez nią jaja. Kolejne generacje roztoczy są więc zakażane *de novo*. Naturalny rezerwuar *B. burgdorferi* stanowią zwierzęta będące kompetentnymi gospodarzami krętka. Do grupy tej należą drobne ssaki oraz ptaki, u których stosunkowo łatwo dochodzi do niegroźnych acz długotrwałych infekcji [37]. Dorosłe kleszcze nie odgrywają znaczącej roli w krążeniu *B. burgdorferi* w przyrodzie, ponieważ żywią się krwią większych ssaków, które nie są dla bakterii kompetentnym gospodarzem. Niemniej jednak, duże ssaki są ważne dla podtrzymania liczebności kleszczy, ponieważ na ich ciele najczęściej dochodzi do kopulacji kleszczy [37].

Poznany w 1997 roku genom szczepu B31 *B. burgdorferi*, zawiera ponad 1750 genów umiejscowionych na liniowym chromosomie (910 kpz) oraz 21 plazmidach (w sumie ich długość wynosi około 610 kpz) – 12 liniowych (lp – *linear plasmid*) i 9 kolistych (cp – *circular plasmid*). Aż 40% informacji genetycznej zakodowana jest w DNA pozachromosomalnym [19]. Badania z użyciem mikromacierzy sugerują, że geny umiejscowione w plazmidach, w większym stopniu niż geny chromosomalne, są zaangażowane w odpowiedź na zmieniające się warunki zewnętrzne [6]. Genom *B. burgdorferi* koduje około 130 lipoprotein – najwięcej spośród znanych genomów bakteryjnych. Większość z nich stanowią białka powierzchniowe, które biorą udział w różnorodnych oddziaływaniach pomiędzy bakterią a gospodarzem oraz pomiędzy bakterią i wektorem. Duża różnorodność plazmidów, w zależności od szczepu i lokalizacji geograficznej stanowi podstawę klasyfikacji bakterii. Znaczna część zawartych w plazmidach genów koduje białka nieposiadające homologów u innych organizmów. Prawdopodobnie białka te decydują o wirulencji patogenu. Utrata większości plazmidów nie wywiera wpływu na propagację bakterii w hodowli, jednak uniemożliwia infekowanie zwierząt laboratoryjnych. Znaczny polimorfizm pozagenomowego DNA sprawia, iż łatwo dochodzi do zmian antygenów bakterii, co w dużym stopniu utrudnia diagnostykę i profilaktykę boreliozy.

W materiale genetycznym *B. burgdorferi* nie zidentyfikowano genów kodujących jakiekolwiek znane toksyny, czy też czynniki potrzebne do ich sekrecji. Uważa się zatem, że uszkodzenia tkanek związane z rozwojem boreliozy są efektem reakcji zapalnej wywołanej przez organizm gospodarza [50].

B. burgdorferi jest obligatoryjnym pasożytem. W związku z tym jej ewolucja, oraz cykl życiowy są ściśle powiązane z ewolucją i sposobem funkcjonowania wektora (bezkręgowca) oraz żywiciela (kręgowca). Przebywanie *B. burgdorferi* w skrajnie różnych warunkach występujących w organizmach gospodarza oraz wektora wymaga odpowiedniego przystosowania poprzez zmianę profilu ekspresji genów (32). Transkrypcja wielu genów, kodujących białka niezbędne podczas migracji bakterii pomiędzy wektorem i gospodarzem oraz podczas infekcji kręgowców, regulowana jest przez alternatywne czynniki transkrypcyjne Rrp2, RpoN i RpoS. Powstawanie czynnika RpoS kontrolowane jest przez czynnik RpoN (znany również jako σ^{54} oraz NtrA) wiążący się do polimerazy RNA [43]. Transkrypcja *rpoS* wymaga przyłączenia kompleksu białkowego w rejonie znajdującym się przed promotorem *rpoS*. W skład tego kompleksu, oprócz RpoN, wchodzi ufosforylowane białko Rrp2 (*Response regulatory protein 2*) oraz czynnik BosR (*Borrelia oxidative stress regulator*; znany również jako Fur) [22, 35]. Ekspresja *rpoS* jest regulowana potranskrypcyjnie przez krótkie RNA DsrA [28], chaperon RNA – Hfq [27] oraz wiążące RNA białko CsrA [23]. Ekspresję wielu genów niezbędnych do kolonizacji wektora uruchamia system złożony z kinazy histydynowej Hk1 (*Histidine kinase 1*) oraz białka Rrp1. Hk1 i Rrp1 kontrolują produkcję cząsteczki sygnalnej cyklicznego di-GMP. Nukleotyd ten uczestniczy w modulacji ekspresji genów, których produkty ułatwiają adaptację bakterii do warunków panujących w przewodzie pokarmowym żerującego kleszcza. W przeciwieństwie do ścieżki Rrp2/RpoN/RpoS uruchamianej tylko przez bakterie znajdujące się w ssącej krew nimfie kleszcza, ścieżka zależna od Hk1 i Rrp1 funkcjonuje zarówno w jelicie żerującej larwy jak i nimfy [7].

Ścieżka Rrp2/RpoN/RpoS jest w pełni aktywna także w początkowym stadium infekcji gospodarza przez *B. burgdorferi*. Uruchamia ona ekspresję genów umożliwiających przetrwanie bakterii w nowym środowisku oraz tłumi ekspresję genów, które były potrzebne do przeżycia *B. burgdorferi* w kleszczu. Krętki rozprzestrzeniają się w organizmie gospodarza, który w ten sposób staje się swoistym rezerwuarem bakterii. *B. burgdorferi* może następnie infekować larwy, nimfy i formy dorosłe kleszcza. Larwa może zostać zainfekowana już podczas jej pierwszego żerowania. W momencie, gdy pasożyt

jest już syty, ścieżka Rrp2/RpoN/RpoS przestaje być aktywna, a uruchamiana jest ekspresja genów fazy kleszczowej (m.in. OspA, którego transkrypcja jest blokowana przez RpoS) [43]. Jednocześnie, aktywowana jest ścieżka Hk1/Rrp1, która jest niezbędna do kolonizacji jelita larwy [7]. Po przeobrażeniu się larwy w nimfę, krętki narażone są na długotrwały głód. W tym okresie ścieżki Rrp2/RpoN/RpoS oraz Hk1/Rrp1 są nieaktywne. Ponownie uruchomiona jest ekspresja genów fazy kleszczowej. Rozpoczęcie żerowania przez nimfę kolejny raz aktywuje ścieżkę Rrp2/RpoN/RpoS, co pociąga za sobą transkrypcję genów niezbędnych do zainfekowania kręgowca i jednocześnie stopniowe tłumienie genów fazy kleszczowej [37, 43]. Oprócz tego, dwuskładnikowy układ Hk1/Rrp1 uruchamia transkrypcję genów, których rodukty pozwalają krętkowi uniknąć antybakteryjnej odpowiedzi ze strony kleszcza [24].

3. Kleszcz jako pasożyt

Kleszcze należą do gromady pajęczaków, podgromady roztoczy i są pasożytami zewnętrznymi głównie kręgowców. W Europie najczęściej spotykane są kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity). Występują one na terenie lasów liściastych oraz mieszanych. Pomiędzy okresami żerowania kleszcze narażone są na wysychanie i dlatego przemieszczają się do warstwy podściółki. Liczebność populacji *I. ricinus* ulega znaczącemu obniżeniu, kiedy okres ich aktywności zbiega się z okresem niskiej zawartości wody w atmosferze [35].

Długość poszczególnych faz cyklu życiowego kleszcza zależy od warunków środowiskowych oraz dostępności żywicieli. Kleszcze żerują na ponad 300 gatunkach kręgowców. We wszystkich stadiach rozwojowych żywią się one krwią gospodarza przez kilka kolejnych dni. Jedynie dorosłe samce żerują bardzo krótko i wypijają niewielką ilość krwi. Larwy piją krew przez 2 do 4 dni, nimfy 4–6 dni, natomiast samice 6–10 dni. Po zakończeniu żerowania postać niedojrzała przekształca się w kolejną formę rozwojową. W pełni dojrzałe samice po żerowaniu składają jaja, a następnie umierają. Z jaj rozwijają się larwy, a z nich powstają nimfy, które następnie przeobrażają się w postać dorosłą. Cały cykl rozwojowy trwa zazwyczaj 2 do 3 lat. W skrajnych przypadkach, kleszcze mogą przetrwać w swoim siedlisku nawet do kilku lat. Aby znaleźć żywiciela, kleszcz wspina się na rośliny i oczekuje na bodźce mechaniczne oraz chemiczne, wytwarzane przez gospodarza, po czym spada na ofiarę [35]. W Europie Środkowej okres aktywności kleszczy rozpoczyna się w marcu i trwa do końca października. Jednak najwyższą aktywność *I. ricinus* wykazuje wczesną wiosną oraz wczesną jesienią [17].

Ze względu na swój pasożytniczy tryb życia kleszcze wykształciły zdolność do pokonywania różnorodnych barier zabezpieczających organizm gospodarza. W tym celu wytwarzają one szereg białek, które szczególnie obficie występują w ślinie tego roztocza. Zidentyfikowano w niej zarówno liczne czynniki przeciwzakrzepowe, jak i rozkurczające naczynia krwionośne, substancje przeciwzapalne oraz immunomodulujące [49].

4. Kolonizacja kleszcza przez *B. burgdorferi*

Do kolonizacji kleszcza przez *B. burgdorferi* dojść może podczas jego żerowania na zakażonym kręgowcu. W procesie tym uczestniczą powierzchniowe białka bakterii, między innymi lipoproteina OspA, która oddziałuje z receptorem TROSPA (*tick receptor for OspA*) obecnym na powierzchni komórek nabłonka jelita kleszcza, oraz lipoproteina OspB, której receptor nie jest znany. Geny *ospA* oraz *ospB* umiejscowione są w pozagenomowym DNA krętka, a ich ekspresję indukują bliżej niezidentyfikowane czynniki uwalniane przez kleszcza, bądź gospodarza podczas ukąszenia. W regulacji ekspresji obu genów uczestniczą alternatywne czynniki transkrypcyjne RpoN/RpoS. Obydwa białka powstają w procesie transkrypcji operonu *ospAB* [1]. Uzyskane metodą rekombinacji DNA białka OspA i OspB wiążą się specyficznie z tkanką pochodzącą z jelita kleszcza, co potwierdza ich udział w kolonizacji kleszcza przez bakterię. Podczas żerowania kleszcza na myszach, które były wcześniej immunizowane antygenami OspA, a następnie zakażone *B. burgdorferi*, nie obserwowano wiązania krętków do nabłonka jelitowego roztocza. Mutanty pozbawione operonu *ospAB* infekują myszy w takim samym stopniu jak typ dziki, nie są jednak w stanie skolonizować kleszcza, ani w nim przetrwać [54]. Wprowadzenie mutacji w genie *ospB* szczepu B31 *B. burgdorferi*, przy zachowaniu funkcjonalnego *ospA*, również ogranicza zdolność infekowania oraz przeżywalność *B. burgdorferi* w kleszczu [30]. Analiza *in vivo* transkryptomu *B. burgdorferi* wykazała, że podczas transferu bakterii z zainfekowanych myszy do żerującego kleszcza następuje wzmożona ekspresja genu *bb0365* kodującego lipoproteinę La7 [20]. Mutanty pozbawione genu *bb0365* zakażają myszy w takim samym stopniu jak typ dziki, jednakże mają znacząco obniżoną przeżywalność w organizmie kleszcza. Nie zaobserwowano wzmożonej ekspresji *bb0365* w żadnej z kolonii bakteryjnych wyizolowanych z różnych tkanek mysich [32]. Ponadto, wykazano, że u pacjentów zakażonych boreliozą immunoglobuliny skierowane przeciwko BB0365 są słabo wykrywalne w testach ELISA [40].

Gdy *B. burgdorferi* znajdzie się w jelicie kleszcza, musi uniknąć strawienia oraz neutralizacji przez system immunologiczny roztocza. Pomimo, iż trawienie u kleszcza zachodzi wewnątrzkomórkowo, a proteazy nie są obecne w świetle jelita, produkty pochodzące

z degradacji hemoglobiny posiadają właściwości przeciwbakteryjne. Ponadto, znaleziono u kleszcza gen kodujący białko defensyno-podobne, który ulega wzmożonej ekspresji po infekcji jelita przez krętki boreliozy. Nie jest jednak znany sposób, w jaki bakteria omija ten rodzaj odpowiedzi immunologicznej [35].

Po nasyceniu się krwią gospodarza niedojrzała forma kleszcza przechodzi przeobrażenie w kolejną formę rozwojową. Jest to proces długotrwały, podczas którego brakuje dostępu do substancji odżywczych. Aby przetrwać ten okres, *Borrelia* uruchamia produkcję odpowiednich białek. Jednym z nich jest białko Dps-podobne (*DNA-binding protein from starved bacteria*), będące ortologiem bakterioferrytyny. Białko to zostało pierwotnie zidentyfikowane w komórkach *Escherichia coli* poddanych długotrwałemu głodzeniu. Stwierdzono, że jego homologi występują u wielu różnych gatunków bakterii. Badania strukturalne wykazały, że białka Dps tworzą dodekamery wykazujące powinowactwo do jonów żelaza oraz DNA. Wiązanie żelaza mogłoby zapobiegać reakcji Fentona, w której powstają reaktywne formy tlenu. U *B. burgdorferi* homolog Dps powstaje jako produkt ekspresji genu chromosomalnego *bb0690*. Wykazano, że białko typu Dps umożliwia *B. burgdorferi* przetrwanie w jelitach kleszcza długotrwałych okresów głodu [26]. W przeciwieństwie do białka pochodzącego z *E. coli*, rekombinowane Dps z *B. burgdorferi* nie wiąże się z DNA, ani nie chroni jego struktury przed uszkodzeniami oksydacyjnymi w testach *in vitro*. Istnieje jednak szereg homologów Dps, które chronią DNA w inny sposób niż białko pochodzące od *E. coli*. *Bacillus brevis* syntetyzuje Dps, w którym nie występuje N-końcowa domena wiążąca DNA, a chromosom bakteryjny jest najprawdopodobniej upakowany pomiędzy tworzące wielowarstwową strukturę dodekamery [41]. Być może *B. burgdorferi* chroni swój materiał genetyczny upakowując go przy pomocy bogatego w cysteiny, C-końcowego odcinka białka Dps [26]. Inne białko ułatwiające *B. burgdorferi* przetrwanie w organizmie kleszcza to lipoproteina powierzchniowa BptA (*Borrelia persistence in tick protein A*). Powstaje ona jako produkt ekspresji genu *bbe16* znajdującego się na plazmidzie lp25. Larwy kleszcza zakażone krętkami *B. burgdorferi* z wyciszonym *bptA*, po przeobrażeniu do stadium nimfy, zawierały znacząco mniejszą ilość bakterii w porównaniu z krętkami typu dzikiego. BptA wykazuje wysoką konserwatywność (powyżej 88% podobieństwa oraz ponad 74% identyczności na poziomie aminokwasowym) w obrębie szczepów *B. burgdorferi s. l.* [42].

Po wyczerpaniu glukozy w jelicie kleszcza, *B. burgdorferi* musi przestawić się na alternatywne źródła węgla potrzebne do glikolizy i syntezy fosfolipidów. U krętków dochodzi wówczas do wzmożonej ekspresji genów z operonu *glp*, który koduje białka odpowiedzialne za przechwytywanie i wykorzystanie cząsteczek glicerolu wytwarzanych przez kleszcza w czasie zimy. W aktywacji operonu *glp* uczestniczą czynniki transkrypcyjne Hk1/Rrp1, natomiast wyłączenie *glp* zachodzi pod wpływem czynnika RpoS [37].

Ponowne pobranie pokarmu przez kleszcza diametralnie zmienia panujące w jelicie warunki. Bakterie odczytują tę zmianę jako sygnał, iż pojawiła się możliwość zasiedlenia kolejnego gospodarza. W rezultacie uruchamiają ekspresję odpowiedniej puli genów. Przez pierwsze 36 godzin żerowania krętki pozostają w jelicie dzięki oddziaływaniu OspA-TROSPA. Po 72 godzinach obserwuje się wykładniczy wzrost populacji *B. burgdorferi* oraz jej rozproszenie w obrębie tkanki jelita [33, 47]. Część krętków przechodzi wtedy przez komórki nabłonka do hemocelu, skąd wędruje dalej do gruczołów ślinowych kleszcza. Migracja krętków nie jest dobrze poznanym procesem. Mogą ją wspomagać interakcje pomiędzy białkami powierzchniowymi bakterii i czynnikami produkowanymi przez kleszcza. Postulowane jest między innymi oddziaływanie powierzchniowej lipoproteiny krętka BBE31 z białkiem TRE31 wydzielanym przez nabłonek jelita podczas żerowania kleszcza [55] oraz wiązanie plazminogenu z OspA [12]. Kolejnym bardzo istotnym białkiem pojawiającym się na powierzchni krętka na tym etapie jego cyklu życiowego jest lipoproteina OspC**.** Gen kodujący OspC stanowi fragment kolistego plazmidu cp26, który występuje u większości szczepów *B. burgdorferi* [8]. Za regulację ekspresji tego genu odpowiedzialne są czynniki transkrypcyjne RpoN/S. OspC łączy się z występującym w ślinie kleszcza białkiem Salp15 [2] w rezultacie dochodzi do opłaszczenia krętków przez to białko. Rola, jaką pełni OspC w oddziaływaniach bakteria-kleszcz, nie jest do końca jasna. Istnieją przesłanki wskazujące, że OspC jest potrzebne krętkowi do przemieszczenia się z jelita kleszcza do jego gruczołów ślinowych [34]. *Knock-out* genu *ospC* powoduje, że *B. burgdorferi* nie jest w stanie zainfekować ssaka. Efekt ten jest obserwowany zarówno, gdy zakażenie następuje w wyniku ukąszenia przez kleszcza jak i gdy bakteria wprowadzona zostaje za pomocą igły. Na tej podstawie można sądzić, że białko to jest niezbędne do rozwoju infekcji w organizmie gospodarza [21, 48]. Równocześnie wykazano, że mutanty *B. burgdorferi*, z wyłączonym genem *ospC* oraz podwyższoną ekspresją jednego z genów kodujących pozostałe białka powierzchniowe (OspA, OspE, VlsE i DbpA) były w stanie zasiedlić organizm myszy. Okazuje się więc, że inne lipoproteiny powierzchniowe krętka są w stanie przejąć funkcję OspC pod warunkiem, że występują obficie na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej bakterii [53]. Lipoproteina BB0323 to kolejne białko występujące w błonie komórkowej *B. burgdorferi*. Wykazano, że jest ono niezbędne dla przetrwania bakterii w wektorze oraz transferu patogenu z kleszcza do organizmu gospodarza. Produkcja bakteryjnego białka BB0323 wzrasta,

gdy zakażony *B. burgdorferi* kleszcz pobiera krew z organizmu gospodarza. Mutanty pozbawione *bb0323* nie są w stanie zainfekować kleszczy, ani myszy. Są one eliminowane w ciągu kilku pierwszych dni infekcji, zarówno u kleszczy, immunokompetentnych myszy, jak i u myszy z zespołem ciężkiego skojarzonego niedoboru odporności. Wykazano również, że zniesienie mutacji *bb0323*, poprzez tzw. komplementację chromosomalną, powoduje w znacznym stopniu odzyskanie wirulencji i przywraca bakteriom zdolność przetrwania w organizmie myszy oraz kleszcza [55].

Lipoproteina BBA07 stanowi kolejny przykład białka, które ulega zwiększonej produkcji podczas żerowania nimfy oraz odgrywa istotną rolę w przepływie *B. burgdorferi* z kleszcza do ssaka [52]. U krętków hodowanych w temperaturze 37°C i obniżonym pH (pH 6,8), czyli w warunkach podobnych do tych panujących w jelicie odżywiającego się kleszcza, ekspresja *bba07* wzrasta ponad 10-krotnie w porównaniu do kontroli (23°C, pH 7,5). Analizy z użyciem mikromacierzy wykazały, że ekspresja *bba07*, obok 100 innych genów wirulencji (m.in. *ospA*, *ospC*), znajduje się pod kontrolą ścieżki Rrp2/RpoN/RpoS [43]. Stwierdzono, że mutacje *rrp2*, *rpoN* lub *rpoS* powodowały nawet 138-krotny spadek ilości transkryptu *bba07* [4, 6, 19]. Mutanty pozbawione BBA07, pomimo, że są w stanie infekować myszy po inokulacji za pomocą igły oraz przeżywają w kleszczu, nie są zdolne do przedostania się do organizmu ssaka poprzez ugryzienie przez kleszcza. Natomiast po komplementacji mutantów za pomocą kopii genu *bba07*, pochodzącej od typu dzikiego, następuje częściowe odwrócenie tego defektu. Mechanizm działania BBA07 nie został jak dotąd poznany, wiadomo jednak, iż białko to ułatwia przepływ *B. burgdorferi* z wektora do gospodarza [52].

6. Białka kleszcza wykorzystywane przez *B. burgdorferi* podczas zakażania organizmu gospodarza

W wyniku koewolucji pomiędzy kleszczem a *B. burgdorferi* ukształtował się niezwykle specyficzny system oddziaływań. Z jednej strony umożliwia on efektywną kolonizację wektora przez bakterię, z drugiej ułatwia transfer bakterii z kleszcza do gospodarza. Kleszcze, jako pasożyty, niemal do perfekcji doprowadziły zdolność przełamywania systemu obronnego gospodarza, krętki tymczasem nauczyły się jak zdolności te wykorzystywać do własnych celów.

W ślinie kleszczy obficie występują czynniki o działaniu przeciwzakrzepowym rozkurczającym naczynia krwionośne, przeciwzapalnym oraz immunomodulującym [49]. Agregacja płytek krwi prowadząca do utworzenia skrzepu stanowi jeden z krytycznych mechanizmów utrzymujących hemostazę naczyń krwionośnych. Za inicjację procesu krzepnięcia odpowiedzialne są trombocyty. W wyniku ich aktywacji uwalniane są liczne czynniki białkowe i niebiałkowe niezbędne do powstania skrzepu, m.in. ADP, serotonina, kolagen, trombina, czynnik PAF (*platelet-activating factor*) oraz tromboksan A2. W ekstrakcie pochodzącym z gruczołów ślinowych kleszcza zidentyfikowano wiele inhibitorów przeciwdziałających agregacji trombocytów *in vitro*. Należą do nich m.in. apyraza, czyli enzym hydrolizujący ADP i ATP, a także prostacyklina PGI_2 oraz dezintegryny zapobiegające wiązaniu się fibrynogenu z płytkami krwi. Inne antykoagulanty występujące w ślinie kleszcza to inhibitory proteaz typu Kunitza, białka Salp9 i Salp14 pochodzące z *I. scapularis* oraz związki wiążące trombinę i czynnik Xa. Dodatkowo u *Haemaphysalis longicornis*, należącego do rodziny kleszczy twardych, odkryto białko będące silnym inhibitorem procesu angiogenezy [18]. Substancje te z pewnością w sposób pośredni ułatwiają przenoszonym przez kleszcza drobnoustrojom inwazję organizmu kręgowca.

System odpornościowy gospodarza stanowi kolejną barierę, którą muszą pokonać nie tylko kleszcze, lecz i krętki. W odpowiedzi na uszkodzenie skóry oraz obecność antygenów organizm kręgowca produkuje między innymi cytokiny oraz białka należące do układu dopełniacza. Stwierdzono, że kleszcze z rodziny obrzeżkowatych wytwarzają lipokalinę, która jest inhibitorem konwertazy C5, dzięki czemu blokuje zarówno klasyczną, jak i alternatywną drogę aktywacji dopełniacza [31]. Dowiedziono, że ślina *I. scapularis* hamuje działanie neutrofilów oraz dezaktywuje anafilatoksyny [18]. Wykazano, że ekstrakt gruczołów ślinowych kleszcza hamuje wydzielanie przez makrofagi oraz komórki dendrytyczne cytokin wywołujących zapalenie (IL-1, IL-12 i TNF-α) [9, 38]. Podobne działanie śliny kleszcza, czyli blokowanie produkcji IL-2 i TNF-γ obserwowano w przypadku limfocytów [18]. U *I. ricinus* opisano białko Iris (*I. ricinus immunosuppressor*), które także hamuje produkcję cytokin prozapalnych [25]. Jednym z białek kleszczowych blokujących dopełniacz, a wykorzystywanych przez *B. burgdorferi*, jest Salp20. Homologiczne białka IRAC I i IRAC II, hamujące alternatywną ścieżkę ludzkiego dopełniacza odkryto u *I. ricinus* [13, 14]. W testach *in vitro* wykazano, że Salp20 zapobiega lizie wrażliwych na serum szczepów *B. burgdorferi*. Możliwe jest zatem, że białko to chroni bakterię przed dopełniaczem, nie tylko w trakcie jej transferu z gospodarza do wektora, ale także we krwi już pobranej i znajdującej się w jelicie kleszcza [35]. Inne białko *I. ricinus*, Salp15, blokuje produkcję IL-2, przez co uniemożliwia aktywację limfocytów T CD4. Białko to oddziałuje z opisaną wcześniej lipoproteiną powierzchniową *B. burgdorferi* OspC. Dzięki temu oddziaływaniu bakterie mogą bez przeszkód wnikać do organizmu żywiciela, gdyż na ich powierzchni tworzy się ochronny płaszcz z białka

Salp15, który chroni je przed przeciwciałami rozpoznającymi białko OspC. Co więcej, zachodzące oddziaływanie pomiędzy OspC i Salp15 może być korzystne również dla kleszcza. Wykazano bowiem, że *B. burgdorferi* indukuje powstawanie większych ilości białka Salp15, dzięki czemu skuteczniej blokowany jest układu odpornościowy. W konsekwencji kleszcz posiada lepsze warunki do żerowania [39]. Kolejne białko wytwarzane w śliniankach i jelicie kleszcza, Salp25D, jest homologiem peroksyredoksyn i należy do rodziny tioredoksyno-zależnych peroksydaz [29]. Białka tego typu występują powszechnie u organizmów żywych i odpowiedzialne są za enzymatyczną dezaktywację m.in. nadtlenku wodoru. Wykazano, że Salp25D skutecznie wymiata wolne rodniki tlenowe produkowane przez zaktywowane neutrofile, chroniąc w ten sposób *B. burgdorferi* przed stresem oksydacyjnym [15]. Wyciszenie ekspresji Salp25D w śliniankach kleszcza znacząco redukuje liczbę krętków w roztoczach po tym, jak spożyły one krew myszy zainfekowanych *B. burgdorferi*. Badania myszy immunizowanych Salp25D i zainfekowanych krętkiem wykazały, że immunoglobuliny skierowane przeciwko Salp25D blokują napływ krętków do kleszczy. Ciekawym wydaje się również fakt, iż wyciszenie *salp25D* w śliniankach hamuje przepływ *B. burgdorferi* do kleszcza, podczas gdy wyciszenie tego genu w jelicie nie wywołuje analogicznego efektu. Wynik powyższego doświadczenia sugeruje, że Salp25D odgrywa istotną rolę w miejscu ukąszenia przez kleszcza [29].

Powstrzymanie u gospodarza reakcji wywołującej ból i swędzenie może być jednym z istotnych czynników decydujących o powodzeniu strategii pasożytniczej kleszcza. Jednym z pierwszych mediatorów bólu jest ATP uwalniany z uszkodzonych komórek. Wykazano, że ślina kleszczy zawiera enzymy degradujące ATP. Obok ATP, bradykinina jest kolejnym związkiem pośredniczącym w wywoływaniu poczucia bólu. Dowiedziono, że bradykinina jest degradowana przez występującą w ślinie kleszcza kininazę [18]. Serotonina i histamina uwalniane przez trombocyty i komórki tuczne również indukują powstawanie bólu, a także zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych. U kleszczy z rodzaju *Dermacentor* wykryto białko SHBP (*serotonine and histamine binding protein*) wiążące obydwa wyżej wymienione związki [44]. Efekt wazodylatacji, czyli rozkurczu mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych, umożliwia kleszczowi efektywniejsze ssanie krwi. W ślinie kleszcza znaleziono prostaglandyny PGE_2 i PGF_{2a}, które działają jak substancje wazodylatacyjne [45]. Dodatkowo, związki te podnoszą ciśnienie krwi w kapilarach, co w połączeniu z większą przepuszczalnością naczyń skutkuje intensywniejszym napływem krwi do tkanki w miejscu ugryzienia [18]. Nie odkryto do tej pory czynników bakteryjnych uwikłanych w bezpośrednie oddziaływania z tą grupą białek kleszcza, jednak działanie czynników łagodzących ból czy wazodylatacyjnych z pewnością wpływa korzystnie na proces infekcji kręgowca przez *B. burgdorferi*.

6. Podsumowanie

Oddziaływania pomiędzy krętkami *B. burgdorferi*, kleszczami i kręgowcami stanowią niezwykle interesujący i skomplikowany przykład wzajemnego dopasowania pomiędzy pasożytem, wektorem i żywicielem. W ciągu minionych 30 lat nastąpił duży postęp w identyfikacji substancji produkowanych przez gruczoły ślinowe kleszcza, które ułatwiają mu żerowanie. Cząsteczki te współgrają ze sobą w celu ominięcia systemu obronnego kręgowca. Pasożyt reguluje dopływ krwi do miejsca ugryzienia w taki sposób, aby pobrać jak największą ilość pożywienia, a jednocześnie nie uruchomić odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. *B. burgdorferi*, a także inne drobnoustroje chorobotwórcze wykorzystują immunomodulacyjne właściwości śliny kleszcza, aby skuteczniej infekować ssaka. Rosnąca wiedza o tych procesach i czynnikach, które w nich uczestniczą stwarza dużą szansę na stworzenie nowych efektywnych metod ograniczających rozprzestrzenianie się zarówno kleszczy jak i roznoszonych przez nie patogenów [35].

Artykuł powstał w wyniku realizacji grantu MNiSW N N302 041536 oraz Programu MPD „Structural biology of plants and microbes", finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego i z budżetu państwa.

Piśmiennictwo

1. Alverson J., Bundle S.F., Sohaskey C.D., Lybecker M.C., Samuels D.S.: Transcriptional regulation of the ospAB and ospC promoters from *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **48**, 1665–1677 (2003)
2. Anguita J., Fikrig E. i wsp.: Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4_ T cell activation. *Immunity*, **16**, 849–859 (2002)
3. Blevins J.S., Xu H., He M., Norgard M.V., Reitzer L., Yang X.F.: Rrp2, a σ54-dependent transcriptional activator of *Borrelia burgdorferi*, activates rpoS in an enhancer-independent manner. *J. Bacteriol.* **191**, 2902–2905 (2009)
4. Boardman B.K., He M., Ouyang Z., Xu H., Pang X., Yang X.F.: Essential role of the response regulator Rrp2 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **76**, 3844–3853 (2008)
5. Brossard M., Wikel S.K.: Tick immunobiology. *Parasitology*, **129**, 161–176 (2004)
6. Caimano M.J., Iyer R., Eggers C.H., Gonzalez C., Morton E.A., Gilbert M.A., Schwartz I., Radolf J.D.: Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Mol. Microbiol.* **65**, 1193–1217 (2007)
7. Caimano M.J., Kenedy M.R., Kairu T., Desrosiers D.C., Harman M., Dunham-Ems S., Akins D.R., Pal U., Radolf J.D.: The hybrid histidine kinase Hk1 is part of a two-component system

that is essential for survival of *Borrelia burgdorferi* in feeding Ixodes scapularis ticks. *Infect. Immun.* **79**, 3117–3130 (2011)
8. Casjens S., Fraser C.M. i wsp.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
9. Cavassani K.A., Aliberti J.C., Dias A.R., Silva J.S., Ferreira B.R.: Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, **114**, 235–245 (2005)
10. Chmielewska-Badora J.: Seroepidemioligic study of Lyme boreliosis in the Lublin Region. *Ann. Agric. Environ. Med*. **5**, 183–186 (1998)
11. Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Wójcik-Fatla A., Polak J., Dutkiewicz J.: Risk of tick-borne bacterial dieseases among workers of Roztocze National Park (South-Eastern Poland). *Ann. Agric. Environ. Med*. **12**, 127–132 (2005)
12. Coleman J.L., Gebbia J.A., Piesman J., Degen J.L., Bugge T.H., Benach JL.: Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*, **89**, 1111–1119 (1997)
13. Couvreur B., Godfroid E. i wsp.: Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One*, **3**, e1400 (2008)
14. Daix V., Vanderplasschen A. i wsp.: *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect. Mol. Biol*. **16**, 155–166 (2007)
15. Das S., Banerjee G., DePonte K., Marcantonio N., Kantor F.S., Fikrig E.: Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J. Infect. Dis.* **184**, 1056–1064 (2001)
16. Derdáková M., Lenčáková D.: Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi sensu lato* with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann. Agric. Environ. Med*. **12**, 165–172 (2005)
17. Dzierzęcka M., Barszcz K.: Borelioza z Lyme u ludzi oraz zwierząt domowych i dziko żyjących. *Kosmos*, **59**, 91–98 (2010)
18. Francischetti I.M., Sa-Nunes A., Mans B. J., Santos I.M., Ribeiro J.M.: The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci*. **14**, 2051–2088 (2009)
19. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
20. Grewe C., Nuske J.H.: Immunolocalization of a 22 kDa protein (IPLA7, P22) of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol. Lett*. **138**, 215–219 (1996)
21. Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P.E., Krum J.G., Bueschel D.M., Schwan T.G., Policastro P.F., Elias A.F., Rosa P.A.: Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **101**, 3142–3147 (2004)
22. Hyde, J.A., Shaw D.K., Smith R. III, Trzeciakowski J.P., Skare J.T.: The BosR regulatory protein of *Borrelia burgdorferi* interfaces with the RpoS regulatory pathway and modulates both the oxidative stress response and pathogenic properties of the Lyme disease spirochete. *Mol. Microbiol.* **74**, 1344–1355 (2009)
23. Karna S.L., Sanjuan E., Esteve-Gassent M.D., Miller C.L., Maruskova M., Seshu J.: CsrA modulates levels of lipoproteins and key regulators of gene expression critical for pathogenic mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun*. **79**, 732–744 (2011)
24. Kostick J.L., Szkotnicki L.T., Rogers E.A., Bocci P., Raffaelli N., Marconi R.T.: The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. *Mol. Microbiol*. **81**, 219–231 (2011)
25. Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Mejri N., Brossard M., Bollen A., Godfroid E.: Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem*. **277**, 10083–10089 (2002)
26. Li X., Pal U., Ramamoorthi N., Liu X., Desrosiers D.C., Eggers C.H., Anderson J.F., Radolf J.D., Fikrig E.: The Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* requires BB0690, a Dps homologue, to persist within ticks. *Mol. Microbiol*. **63**, 694–710 (2007)
27. Lybecker M.C., Abel C.A., Feig A.L., Samuels D.S.: Identification and function of the RNA chaperone Hfq in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol*. **78**, 622–635 (2010)
28. Lybecker M.C., Samuels D.S.: Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **64**, 1075–1089 (2007)
29. Narasimhan S., Fikrig E. i wsp.: A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host. Microbe*. **2**, 7–18 (2007)
30. Neelakanta G., Li X., Pal U., Liu X., Beck D. S., DePonte K., Fish D., Kantor F.S., Fikrig E.: Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog*. **3**, e33 (2007)
31. Nunn M.A., Sharma A., Paesen G.C., Adamson S., Lissina O., Willis A.C., Nuttall P.A.: Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol*. **174**, 2084–2091 (2005)
32. Pal U., Dai J., Li X., Neelakanta G., Luo P., Kumar M., Wang P., Yang X., Anderson J.F., Fikrig E.: A differential role for BB0365 in the persistence of *Borrelia burgdorferi* in mice and ticks. *J. Infect. Dis*. **197**, 148–155 (2008)
33. Pal U., Fikrig E. i wsp.: TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell,* **119**, 457–468 (2004)
34. Pal U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L.K., Anderson J.F., Flavell R.A., Norgard M.V., Fikrig E.: OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J. Clin. Invest*. **113**, 220–230 (2004)
35. Pal U., Fikrig E. (w) *Borrelia:* Molecular Biology, Host Interactions, and Pathogenesis, red. Samuels D. S., Radolf J. D., Caister Academic, Norfolk, 279–298 (2010)
36. Piesman J., Schwan T.G. (w) *Borrelia:* Molecular Biology, Host Interactions, and Pathogenesis, red. Samuels D.S., Radolf J.D., Caister Academic, Norfolk, 251–278 (2010)
37. Radolf J.D., Caimano M.J., Stevenson B., Hu L.T.: Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol*. **10**, 87–99 (2012)
38. Ramachandra R.N., Wikel S.K.: Modulation of host-immune responses by ticks (*Acari: Ixodidae*): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol*. **29**, 818–826 (1992)
39. Ramamoorthi N., Fikrig E. i wsp.: The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature,* **436**, 573–577 (2005)
40. Rauer S., Wallich R., Neubert U.: Recombinant low-molecular--mass proteins pG and LA7 from *Borrelia burgdorferi* reveal low diagnostic sensitivity in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol*. **39**, 2039–2040 (2001)
41. Ren B., Tibbelin G., Kajino T., Asami O., Ladenstein R.: The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center. *J. Mol. Biol*. **329**, 467–477 (2003)
42. Revel A.T., Blevins J.S., Almazán C., Neil L., Kocan K.M., de la Fuente J., Hagman K.E., Norgard M.V.: *bptA (bbe16)* is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6972–6977 (2005)
43. Samuels D.S.: Gene regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Microbiol*. **65**, 479–499 (2011)
44. Sangamnatdej S., Paesen G.C., Slovak M., Nuttall P.A.: A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect. Mol. Biol*. **11**, 79–86 (2002)

45. Sá-Nunes A., Bafica A., Lucas D.A., Conrads T.P., Veenstra T.D., Andersen J.F., Mather T.N., Ribeiro J.M., Francischetti I.M.: Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J. Immunol*. **179**, 1497–1505 (2007)
46. Śpiewak R.: Zawodowe choroby skóry u rolników indywidualnych. *Post. Dermatol. Alergol*. **21**, 278–285 (2004)
47. Srivastava S.Y., de Silva A.M.: Reciprocal expression of ospA and ospC in single cells of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol*. **190**, 3429–3433 (2008)
48. Tilly K., Bestor A., Jewett M.W., Rosa P.: Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infect. Immun*. **75**, 1517–1519 (2007)
49. Valenzuela J.G., Francischetti I.M., Pham V.M., Garfield M.K., Mather T.N., Ribeiro J.M.: Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Exp. Biol*. **205**, 2843–2864 (2002)
50. Weis J.J., Bockenstedt L.K. (w) *Borrelia:* Molecular Biology, Host Interactions, and Pathogenesis, red. Samuels D.S., Radolf J.D., Caister Academic, Norfolk, 413–441 (2010)
51. Wodecka B., Skotarczak B.: Genetyczna zmienność *Borrelia burgdorferi s. l.* u kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w północnozachodniej Polsce. *Wiad. Parazytol*. **46**, 475–485 (2000)
52. Xu H., He M., He J.J., Yang X.F.: Role of the surface lipoprotein BBA07 in the enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun*. **78**, 2910–2918 (2010)
53. Xu Q., McShan K., Liang F.T.: Essential protective role attributed to the surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* against innate defences. *Mol. Microbiol*. **69**, 15–29 (2008)
54. Yang X.F., Pal U., Alani S.M., Fikrig E., Norgard M.V.: Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med*. **199**, 641–648 (2004)
55. Zhang X., Yang X., Kumar M., Pal U.: BB0323 function is essential for *Borrelia burgdorferi* virulence and persistence through tick-rodent transmission cycle. *J. Infect. Dis*. **200**, 1318–1330 (2009)
56. Zhang L., Zhang Y., Adusumilli S., Liu L., Narasimhan S., Dai J., Zhao Y.O., Fikrig E.: Molecular interactions that enable movement of the Lyme disease agent from the tick gut into the hemolymph. *PLoS Pathog*. **7**, e1002079 (2011)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 17–28
http://www.pm.microbiology.pl

WIRUS CYTOMEGALII – PROBLEM ZAKAŻEŃ WRODZONYCH

Milena Dunal[1], Agnieszka Trzcińska[1], Joanna Siennicka[1]*

[1]Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Budowa wirusa cytomegalii. 3. Replikacja CMV. 4. Latencja. 5. Patogeneza i formy kliniczne zakażenia. 6. Epidemiologia. 7. Zakażenie wrodzone CMV. 8. Diagnostyka zakażeń wrodzonych. 8.1. Oznaczenia serologiczne u matki. 8.2. Badanie płynu owodniowego. 8.3. USG. 8.4. Diagnostyka zakażenia wrodzonego u noworodka. 9. Profilaktyka i leczenie. 9.1. Szczepionka. 9.2. Bierna immunizacja. 9.3. Leki przeciwwirusowe. 9.4. Zapobieganie zakażeniom CMV. 10. Podsumowanie

Cytomegalovirus – problems due to congenital infection

Abstract: Human cytomegalovirus (CMV) is the most common cause of perinatal viral infections in the developed world and the leading cause of congenital infections. About 30–40% infected pregnant women transmit the infection to their fetus. The consequences of CMV infection on pregnant women are very diverse, however, due to their universality, are a serious public health problem. Therefore, the development of prevention in the form of an effective vaccine is one of the priorities of the World Health Organization. Until the vaccine is implemented, it seems very important to raise awareness about the risks associated with CMV infection. The epidemiology, clinical manifestations, prevention, diagnosis and treatment of CMV congenital infection are reviewed.

1. Introduction. 2. The structure of cytomegalovirus. 3. CMV replication. 4. Latency. 5. Pathogenesis and clinical forms of infection. 6. Epidemiology. 7. Congenital CMV infection. 8. Diagnosis of congenital infection. 8.1. Serological tests for mothers. 8.2. Examination of amniotic fluid. 8.3. USG. 8.4. Diagnosis of congenital infection in a newborn. 9. Prevention and treatment. 9.1. The vaccine. 9.2. Passive immunization. 9.3. Antivirals. 9.4. Prevention of CMV infection. 10. Summary

Słowa kluczowe: CMV, zakażenie wrodzone, zapobieganie, diagnostyka, leczenie
Key words: CMV, congenital infection, prevention, diagnosis, treatment

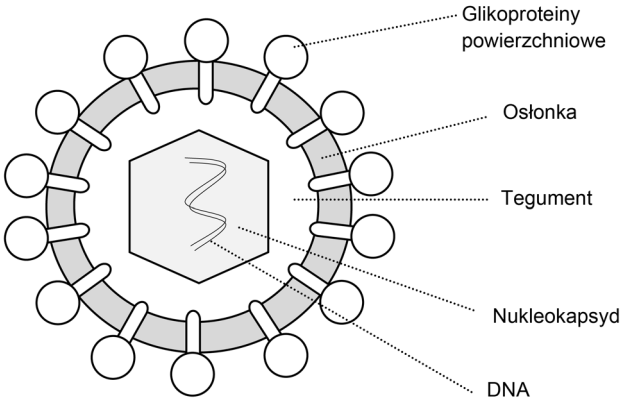
1. Wstęp

Wirus cytomegalii (CMV) jest najczęstszą przyczyną zakażeń wrodzonych u ludzi. Szacuje się, że corocznie w USA rodzi się około 40 000 zakażonych dzieci. Konsekwencje zakażenia są bardzo różne, jakkolwiek ze względu na ich powszechność, stanowią poważny problem zdrowia publicznego. Dlatego też opracowanie profilaktyki w postaci skutecznej szczepionki stanowi jeden z priorytetów Światowej Organizacji Zdrowia. Jednak do czasu opracowania takiej szczepionki jedyną formą zapobiegania transmisji CMV, szczególnie wśród kobiet w wieku prokreacyjnym, zwłaszcza w sytuacji niskiej świadomości dotyczącej możliwości zagrożenia jest edukacja. W większości krajów, w tym w Polsce, nie prowadzi się rutynowych badań w kierunku CMV u kobiet ciężarnych. Podjęcie tej decyzji argumentowane jest w sposób następujący: 1) Istnienie udokumentowanej odporności w postaci obecności przeciwciał anty-CMV IgG nie wyklucza możliwości zakażenia wrodzonego, 2) Zakażenie wewnątrzmaciczne nie zawsze prowadzi do wystąpienia zakażenia objawowego i późniejszych następstw u dziecka, 3) Nie ma ustalonego postępowania leczniczego w stosunku do płodu, 4) Badania rutynowe mogą wywoływać niepotrzebny niepokój u ciężarnej, szczególnie jeśli są wykonywane bez zapewnienia odpowiedniej porady dotyczącej interpretacji wyniku, 5) Koszty badań rutynowych są wysokie i nieopłacalne w obliczu braku skutecznej interwencji terapeutycznej [69]. Wydaje się jednak, że logicznie uzasadniona decyzja o wykluczeniu z rutynowych badań oznaczeń w kierunku CMV może być jedną z przyczyn obniżenia świadomości zagrożeń jakie niesie zakażenie wirusem cytomegalii w ciąży. Znajomość aktualnych zagadnień związanych z zakażeniem CMV – replikacją wirusa, odpowiedzią immunologiczną, patogenezą, diagnostyką oraz możliwościami terapeutycznymi i profilaktycznymi, może przyczynić się do zweryfikowania stanowiska dotyczącego badań profilaktycznych mających na celu ograniczenie liczby zakażeń wrodzonych będących wynikiem zakażenia CMV.

2. Budowa wirusa cytomegalii

Gatunkowo swoisty wirus cytomegalii należy do rodziny *Herpesviridae*. Rodzina ta obejmuje trzy podrodziny, do których należy osiem patogenów człowieka: *Alphaherpesvirinae* (HSV-1, HSV-2, VZV), *Betaherprsvirinae* (CMV, HHV-6, HHV-7) i *Gammaherpesvirinae* (EBV, HHV-8). Genom wirusa cytomegalii stanowi podwójna nić liniowego DNA o długości 124–235 kpz,

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny; 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24; tel. (22)5421230; e-mail: jsiennicka@pzh.gov.pl



Rys. 1. Budowa cząsteczki wirusa cytomegalii

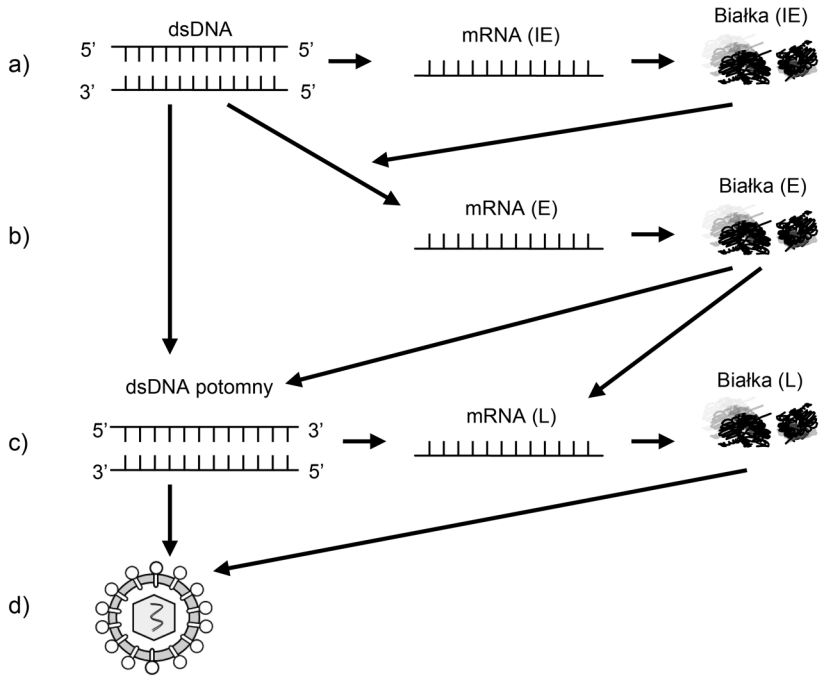
związana z kapsydem o średnicy 100–110 nm. Kapsyd zbudowany jest ze 162 podjednostek ułożonych w symetrii ikosahedralnej. Nukleokapsyd otoczony jest warstwą białek, składających się na tegument, oraz fosfolipidową osłonką, w której zakotwiczone są białka powierzchniowe tworzące wypustki [93] (Rys. 1).

Wirus cytomegalii jest jednym z najbardziej złożonych wirusów. Możliwości kodujące genomu CMV określa się na ponad 200 białek [33]. Najistotniejszymi, z punktu widzenia reakcji odpornościowych białkami CMV, są te, których antygeny stymulują odpowiedź ze strony a) przeciwciał neutralizujących – są to glikoproteiny: B (gB, gpUL55), H (gH, gpUL75), kompleks gN-gM (gpUL73-gpUL100); b) limfocytów cytotoksycznych – pp65 (ppUL83), IE1 (ppUL123), glikoproteiny gB i gH; oraz c) limfocytów pomocniczych – pp65, IE1, glikoproteiny gB i gH [81]. Do badania zmienności szczepów CMV wykorzystywany jest gen UL55 kodujący gB, dla którego wykazano istnienie czterech różnych genotypów (gB1, gB2, gB3, gB4), co ma istotne znaczenie w badaniach transmisji wirusa [19]. Poza tym, spośród wielu genów CMV na szczególną uwagę zasługują te, związane z lekoopornością – UL54 kodujący białko wczesne – pUL54 (DNA POL, p140), wirusową polimerazę oraz UL97 kodujący białko wczesne (pUL97), fosfoproteinę o aktywności kinazy, biorące udział w łączeniu kapsydów i syntezie wirusowego DNA [17].

3. Replikacja CMV

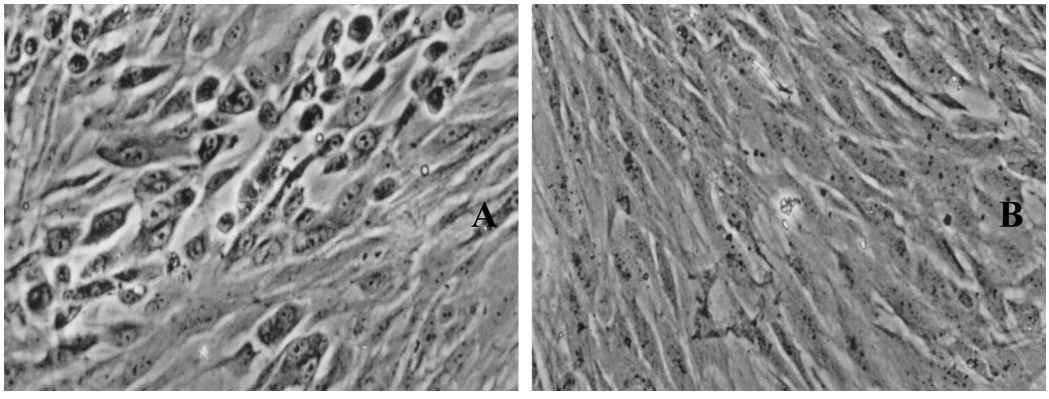
Replikacja wirusa cytomegalii przebiega według schematu typowego dla wirusów o dwuniciowym DNA (Rys. 2). CMV powszechnie uważany jest za wolno replikujący się wirus. Czas pełnego cyklu replikacyjnego wynosi około 96 godzin [38]. Proces replikacyjny rozpoczyna się przyłączeniem, fuzją a następnie penetracją do wnętrza komórki gospodarza. Dobrze poznanym receptorem komórkowym biorącym udział w pierwszej fazie zakażenia jest EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) oraz, na co wskazują nowe doniesienia, PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) [16, 60]. Określenie, który z nich pełni kluczową rolę w procesie wnikania wirusa do komórki ma duże znaczenie dla badań związanych z opracowaniem nowych preparatów przeciwwirusowych. Najważniejszym wirusowym białkiem receptorowym jest glikoproteina powierzchniowa gB [30].

Po etapie przyłączania i fuzji wirus ulega odpłaszczeniu. Materiał genetyczny transportowany jest do



Rys. 2. Schemat replikacji wirusa cytomegalii (CMV)

Etapy replikacji wirusa obejmują: a) syntezę białek bezpośrednio-wczesnych (IE), b) syntezę białek wczesnych (E), c) syntezę białek późnych (L) i d) składanie cząstek wirusowych



Rys. 3. A – Efekt cytopatyczny wirusa cytomegalii (szczep Towne) w pierwotnej hodowli fibroblastów człowieka (MRC5), B – kontrola (zdjęcia autorów)

jądra komórkowego gdzie następuje kaskadowa synteza 3 rodzajów mRNA: bezpośrednio-wczesnego (IE, *Immediately-Early*), wczesnego (E, *Early*) i późnego (L, *Late*). W cytoplazmie komórki gospodarza, wirusowe mRNA przy wykorzystaniu jego aparatu komórkowego, bierze udział w translacji białek. Te ulegają w dalszych etapach przemianom potranslacyjnym: fosforylacji, glikozylacji i proteolitycznym podziałom. Synteza wirusowego DNA zachodzi w jądrze komórkowym, gdzie odbywa się również proces składania nukleokapsydów. Podczas opuszczania jądra komórkowego, nukleokapsydy zaopatrywane są w warstwę białek tworzących tegument oraz osłonkę. Proces replikacji kończy się osadzeniem w osłonce białek powierzchniowych i opuszczeniem komórki, co równoznaczne jest z jej lizą [94]. Dzięki właściwościom jednego z białek (US28), CMV zdolny jest do tworzenia syncytiów. Fuzja komórek przyspiesza rozprzestrzenianie się zakażenia a ponadto pozwala znajdującemu się wewnątrz komórki wirusowi na uniknięcie działania ze strony przeciwciał neutralizujących [15]. Obraz mikroskopowy efektu cytopatycznego CMV w hodowlach komórek MRC-5 przedstawiono na Rys. 3.

4. Latencja

Wirus cytomegalii, tak jak inne herpeswirusy, ma zdolność do ustanawiania długotrwałej latencji. Genom wirusa występuje w postaci pozachromosomalnych episomów w liczbie od 2 do 13 kopii w każdej zakażonej komórce [86]. CMV ma zdolność zakażania komórek śródbłonka, nabłonka, monocytów, makrofagów, komórek mięśniówki gładkiej i granulocytów [63]. Miejscem latencji wirusa są monocyty, makrofagi oraz komórki pregenitorowe o fenotypie CD33+CD34+. Ze stanu latencji wirus cytomegalii może okresowo ulegać reaktywacji. Podczas reaktywacji zakażenia zachodzi pełny cykl replikacyjny, co skutkuje produkcją zakaźnych cząstek wirusowych.

Do reaktywacji zakażenia latentnego konieczna jest aktywacja regionu IE. W zakażonej komórce za utrzymanie stanu latencji odpowiadają białka komórkowe powodujące represję transkrypcji regionu promotorowego dla genów bezpośrednio-wczesnych (MIEP, *Major Immediate Early Promoter*) [84, 92]. Przyjmuje się, że kluczową rolę w przełamaniu tej represji mogą mieć czynniki takie jak deficyt odpowiedzi immunologicznej gospodarza, indukcja genów IE wirusa poprzez czynniki związane z różnicowaniem się komórek gospodarza, procesy zapalne i aktywacja makrofagów [41]. Z drugiej strony wiadomo, że wirus CMV może być istotnym czynnikiem reaktywacji innych herpeswirusów [7].

5. Patogeneza i formy kliniczne zakażenia

Do zakażenia CMV dochodzi w wyniku ekspozycji na materiały takie jak ślina, mocz, krew, mleko, zawierające zakaźne cząstki wirusa. Ze względu na sposób, czas bądź przebieg kliniczny, zakażenia wirusem cytomegalii mogą być dzielone na: wrodzone lub nabyte, naturalne lub jatrogenne, pierwotne lub wtórne, objawowe lub bezobjawowe.

U osób ze sprawnym układem immunologicznym zakażenie CMV w większości przypadków przebiega bezobjawowo. Rzadko przybiera postać syndromu mononukleozopodobnego z nieswoistymi objawami grypopodobnymi takimi jak złe samopoczucie, bóle mięśniowe, długotrwała gorączka, zaburzenia w funkcjonowaniu wątroby, limfocytoza ze wzrostem atypowych limfocytów, często bez uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych [38]. Oddzielny i niezmiernie poważny problem zakażenie to stanowi u osób z immunosupresją (zakażonych wirusem HIV, biorców przeszczepów), oraz, co jest tematem tej pracy – kobiet ciężarnych.

Po wniknięciu do organizmu wirus rozprzestrzenia się drogą krwi do różnych organów: nerek, śledziony, wątroby, serca, mózgu, siatkówki, okrężnicy, ucha wewnętrznego, płuc, ślinianek [85]. Miejsce początkowego zakażenia i sposób, w jaki wirus dostaje się do krwi pozostają nieznane. W czasie wiremii DNA wirusa stwierdzane jest w komórkach krwi obwodowej:

monocytach, limfocytach i neutrofilach [22]. Wirus replikujący w makrofagach nie powoduje ich lizy, a gromadzi się w dużych cytoplazmatycznych wakuolach, które nie mają zdolności do łączenia się z błoną cytoplazmatyczną komórki. Uniemożliwia to prezentację antygenów wirusa oraz pozwala na rozprzestrzenienie się wraz z makrofagami po całym organizmie i zakażanie komórek endotelium i fibroblastów [85].

Jednym z ważnych aspektów zakażenia CMV jest zdolność wirusa do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W taktyce przetrwania w organizmie wirus cytomegalii stosuje różne strategie, między innymi ograniczenie prezentacji własnych antygenów poprzez blokowanie powierzchniowej ekspresji HLA I i HLA II oraz fosforylację białek bezpośrednio-wczesnych, hamowanie apoptozy, blokowanie lizy przez komórki NK w wyniku prezentacji glikoproteiny wirusowej będącej homologiem cząsteczki MHC I [74]. Zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej sprzyja rozwojowi chronicznego zakażenia z okresowymi, bezobjawowymi epizodami reaktywacji, w trakcie których dochodzi do aktywnej replikacji wirusa i krążenia w organizmie jego zakaźnych cząstek. Ma to miejsce mimo istnienia mechanizmów odporności wytworzonych w wyniku zakażenia pierwotnego – obecności wirusowo-swoistych przeciwciał oraz komórek pamięci. Tak więc istniejąca odporność nie zabezpiecza przed reaktywacją zakażenia latentnego, nie zabezpiecza też przed nadkażeniem egzogennymi szczepami wirusa.

Liczne badania nad patogenezą zakażenia wrodzonego CMV wskazują na znaczącą rolę łożyska w tym procesie [48, 59]. Wynika z nich między innymi, że wiele objawów wrodzonego zakażenia CMV może być związanych nie z bezpośrednim działaniem wirusa w stosunku do płodu, a z zakażeniem łożyska i jego dysfunkcją w zakresie dotlenienia i odżywienia płodu [59].

6. Epidemiologia

Rozpowszechnienie wirusa cytomegalii w populacji jest duże. Odsetek osób seropozytywnych w krajach wysokorozwiniętych szacuje się na około 40–60%, natomiast w krajach rozwijających się liczba ta osiąga poziom powyżej 80% [69]. Poziom seroprewalencji wśród kobiet w Europie jest bardzo zróżnicowany (od 30% do około 90%) i zależy od takich czynników jak wiek, pochodzenie, status socjo-ekonomiczny [58].

Do zakażenia CMV dochodzi poprzez wydzieliny i wydaliny człowieka zawierające zakaźne cząstki wirusa. Podczas aktywnego zakażenia wirus w wysokiej koncentracji znajduje się w takich materiałach jak ślina, mocz i krew. Do zakażenia może dojść w wyniku kontaktów seksualnych na skutek obecności wirusa CMV w nasieniu i wydzielinach dróg rodnych. Konsekwencją obecności wirusa cytomegalii w komórkach krwi jest możliwość przenoszenia zakażenia poprzez transfuzję bądź przeszczep. Do zakażenia z reguły dochodzi we wczesnym dzieciństwie. Stwierdzono, że dzieci uczęszczające do przedszkoli są znaczącym źródłem wirusa. Wynika to między innymi z faktu długotrwałego utrzymywania się aktywnej infekcji u dzieci w wieku poniżej lat trzech. Wirus wykrywany jest w ślinie i moczu dzieci po 6 a nawet do 42 miesięcy po zakażeniu [5]. Szacuje się, że od 15% do 70% dzieci uczęszczających do przedszkola ulega infekcji [4]. W związku z powyższym logiczne jest, że dzieci są znaczącym źródłem zakażenia CMV dla swoich matek. Badania wykazały, że co najmniej 50% seronegatywnych kobiet, których dzieci objęte są opieką przedszkolną ulega serokonwersji w ciągu jednego roku [3]. Stwierdzono też, że największym czynnikiem ryzyka zakażenia w czasie ciąży jest częsty i długotrwały kontakt z dziećmi w wieku poniżej 3 lat [6]. Z powyższego wynika więc, że grupą kobiet wysokiego ryzyka są matki tych dzieci oraz osoby zawodowo zajmujące się opieką nad nimi – pracownice żłobków i przedszkoli [1, 71]. Co ciekawe, stwierdzono, że wysokie ryzyko zakażenia nie dotyczy pracownic służby zdrowia, nawet tych na co dzień zajmujących się małymi dziećmi [6, 27]. Wskazuje to na rolę reżimu higienicznego w rozprzestrzenianiu się zakażenia CMV, dużo bardziej restrykcyjnego w warunkach szpitalnych i ambulatoryjnych niż domowych czy przedszkolnych.

Wirus CMV jest obecny w mleku seropozytywnych kobiet i może być przyczyną zakażenia u noworodków karmionych piersią [90]. Szacuje się, że ryzyko transmisji wirusa tą drogą wynosi 58–69%. Pomimo wysokiej transmisji, zakażenia nabywane w ten sposób z reguły są bezobjawowe [28, 89]. Nie istnieją więc żadne przeciwskazania do karmienia piersią zdrowych noworodków. Jako jedyną grupę zwiększonego ryzyka wskazuje się noworodki z niską masą urodzeniową i wcześniaki. W celu zmniejszenia u nich ryzyka zakażenia zaleca się krótkotrwałą pasteryzację lub zamrażanie mleka do temperatury –20°C. Jakkolwiek nie ma danych jednoznacznie wskazujących na skuteczność takiego postępowania to stwierdzono, że można w ten sposób osiągnąć obniżenie poziomu wirusa w mleku bez utraty jego właściwości pokarmowych i ochronnych [40].

7. Zakażenie wrodzone CMV

Do zakażenia CMV może dojść w trakcie trwania ciąży, w czasie porodu bądź w okresie poporodowym. Nabycie zakażenia w okresie płodowym (zakażenie wrodzone) jest związane z najpoważniejszymi konsekwencjami podczas gdy te, nabywane w okresie noworodkowym (zakażenie okołoporodowe i poporodowe) z reguły mają przebieg bezobjawowy. Zakażenie kobiety ciężarnej może mieć różne konsekwencje, od braku transmisji wirusa pomimo istnienia zakażenia u matki, do śmierci

płodu lub noworodka w wyniku infekcji. Może również dochodzić do sytuacji, w których ma miejsce zakażenie łożyska bez zakażenia płodu, zakażenie płodu o charakterze bezobjawowym bez późniejszych następstw, zakażenie płodu, które ma charakter bezobjawowy w czasie porodu ale może być związane z późniejszymi następstwami, jak również może mieć miejsce zakażenie płodu o charakterze objawowym, które najczęściej jest również związane z wystąpieniem późnych następstw.

Duży odsetek, bo aż 85–90% noworodków z wrodzonym zakażeniem CMV nie wykazuje żadnych objawów infekcji podczas porodu. Objawy te mogą się jednak ujawnić po kilku miesiącach bądź nawet latach (późne następstwa zakażenia CMV) i sytuacja taka ma miejsce w około 15–25% przypadków [6, 66].

Jedynie 10% nowonarodzonych dzieci z wrodzonym zakażeniem CMV wykazuje objawy tego zakażenia podczas porodu. Objawy te to: małogłowie, ograniczenie wzrostu, powiększenie wątroby, żółtaczka, wybroczyny, anemia, objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, ślepota, niedosłuch, a nawet głuchota. [12, 70]. Szczególną uwagę zwraca się na zakażenie CMV jako najczęstszą z przyczyn utraty słuchu (SNHL – *Sensorineural hearing loss*). Jako późne następstwo zakażenia wrodzonego CMV, niedosłuch bądź głuchota może nastąpić w późnym dzieciństwie. Badania wykazały, że od 6% do 23% dzieci, które nie wykazywały objawów zakażenia CMV w okresie poporodowym i noworodkowym, w późniejszym dzieciństwie traciły słuch [32].

Zakażenia przezłożyskowe wirusem cytomegalii są najczęstszymi wrodzonymi zakażeniami wirusowymi, które dotyczą od 1 do 2% noworodków [87]. Dochodzi do nich na skutek zarówno pierwotnego, jak i wtórnego (reaktywacji bądź reinfekcji) zakażenia matki [13]. Jednakże to pierwotne zakażenie ciężarnej jest związane z największym ryzykiem urodzenia dziecka z zakażeniem wrodzonym i wystąpieniem bezpośrednich bądź odległych jego następstw [91, 95].

Do zakażenia płodu może dojść w każdym okresie ciąży. Podczas gdy w większości badań nie stwierdzano związku między poziomem transmisji wirusa do płodu a czasem trwania ciąży [36, 37, 88], to B o d e u s i wsp. [9, 10], na podstawie oznaczeń wykonanych u 524 kobiet określili, że ryzyko transmisji rośnie wraz z czasem trwania ciąży od 34,5% w I trymestrze do 73,3% w III trymestrze. Natomiast co do okresu zakażenia w ciąży i jego konsekwencji istnieje zgoda – im wcześniej dochodzi do zakażenia u ciężarnej, tym gorsze są rokowania u dziecka. Jeżeli do zakażenia dochodzi między 4 a 22 tygodniem, to ryzyko wystąpienia objawowej formy zakażenia wrodzonego oraz ciężkich upośledzeń szacuje się odpowiednio na 12% i 29%. Ryzyko ujawniania się konsekwencji zakażenia jest dużo mniejsze jeśli dochodzi do niego w późniejszych tygodniach ciąży. Przy zakażeniu ciężarnej między 16 a 27 tygodniem, objawy przy urodzeniu obserwuje się u 16% noworodków przy praktycznie zerowym ryzyku wystąpienia ciężkich uszkodzeń. Natomiast zakażenie w III trymestrze ciąży z reguły nie wiąże się z ryzykiem wystąpienia ciężkich powikłań, co jednak nie oznacza możliwości ujawnienia się przebytego zakażenia wrodzonego w późniejszym okresie życia dziecka [88].

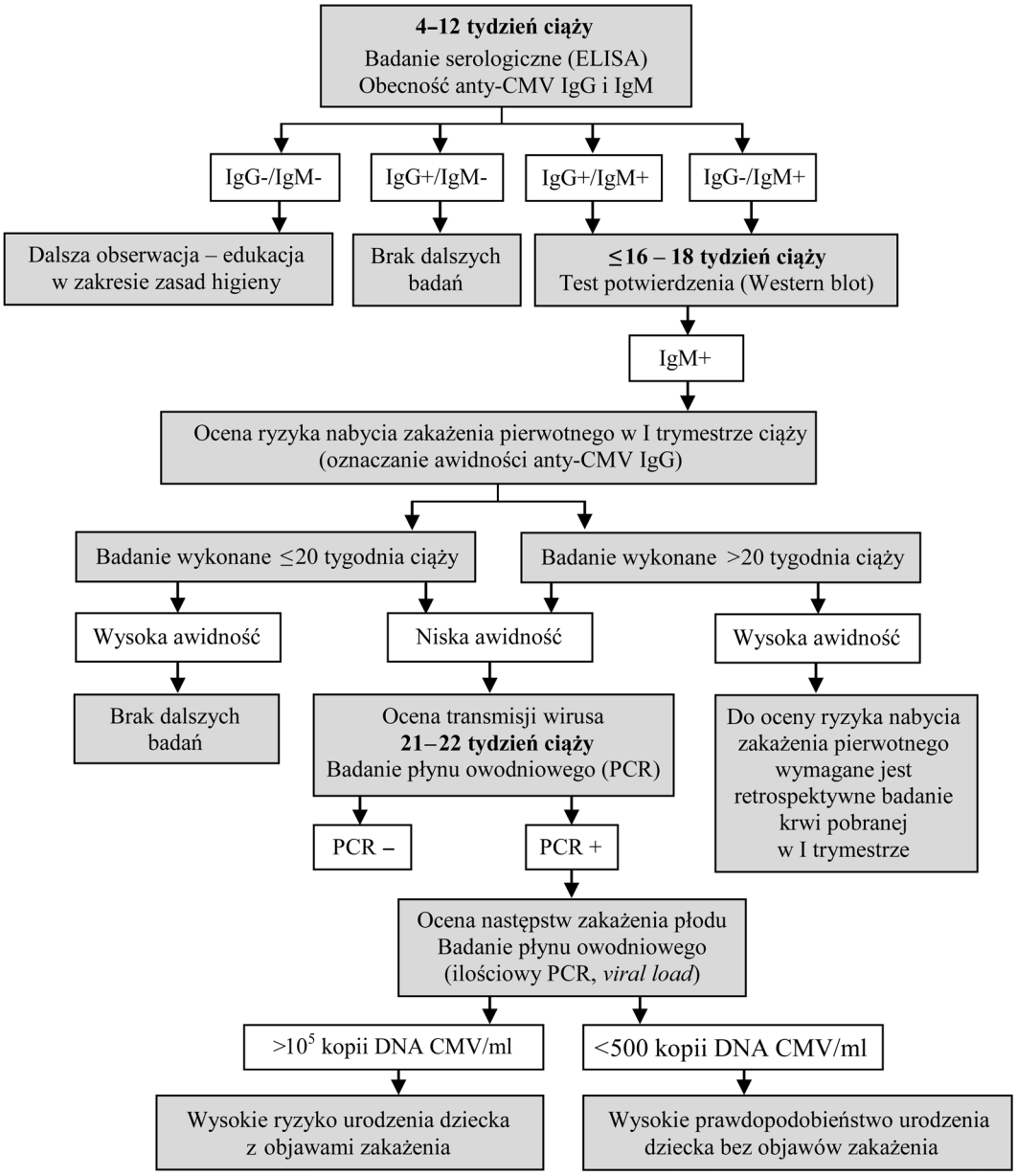
8. Diagnostyka zakażeń wrodzonych

Jedynie w nielicznych krajach prowadzi się rutynowe badania w kierunku zakażeń wrodzonych CMV. W Europie program mający na celu wykrywanie zakażeń pierwotnych u ciężarnych, był prowadzony przez kilka lat we Włoszech. Program ten opierał się na schemacie diagnostycznym opracowanym przez L a z z a r o t t o i wsp. [53]. Obecnie we Włoszech oraz kilku innych krajach europejskich badania są prowadzone, ale na ograniczoną skalę. Wykonuje się je u kobiet z grup wysokiego ryzyka oraz we wszystkich przypadkach podejrzenia wystąpienia zakażenia wrodzonego [31]. Schemat diagnostyki laboratoryjnej zakażenia CMV w ciąży przedstawiono na Rys. 4.

8.1. Oznaczenia serologiczne u matki

W związku z tym, że największe ryzyko wystąpienia ciężkich uszkodzeń płodu związane jest z zakażeniem pierwotnym u matki, to głównym celem diagnostyki zakażeń wrodzonych CMV jest potwierdzenie bądź wykluczenie tego zakażenia. Najpewniejszą metodą potwierdzenia jest stwierdzenie serokonwersji tj. wykrycie obecności CMV swoistych przeciwciał klasy IgG u uprzednio seronegatywnej kobiety. Z drugiej strony, jeżeli w okresie prekoncepcyjnym stwierdzono obecność przeciwciał IgG, to pozwala to wykluczyć pierwotne zakażenia w trakcie ciąży. W związku z powyższym, wykonywanie badań profilaktycznych na sens. Wykrycie obecności CMV-swoistych przeciwciał klasy IgM potwierdza aktualne bądź niedawno przebyte zakażenie. Jest pomocnym wskaźnikiem w diagnostyce pierwotnego zakażenia, aczkolwiek badanie to ma kilka ograniczeń. Po pierwsze, przeciwciała klasy IgM mogą być produkowane we wtórnych infekcjach (reaktywacjach zakażeń latentnych bądź reinfekcjach nowym szczepem) [88]. Po drugie, przeciwciała klasy IgM zwykle utrzymują się 3–6 miesięcy ale mogą być stwierdzane nawet powyżej 12 miesięcy od momentu zakażenia [76]. Po trzecie, istnieją błędy wynikające z jakości testów diagnostycznych, a co za tym idzie, istnieje możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich [51].

U kobiet ciężarnych, u których wykryto przeciwciała anty-CMV IgM, pomocnym narzędziem diagnostycznym jest oznaczanie awidności przeciwciał anty-CMV IgG. Stwierdzono, że przeciwciała produkowane



Rys. 4. Schemat diagnostyki laboratoryjnej zakażenia CMV w ciąży. Na podstawie Lazzarotto i wsp. [53] i Munro i wsp. [64]

w wyniku pierwotnego zakażenia mają niską siłę wiązania antygenu (niską awidność). W miarę rozwoju zakażenia, po około 20 tygodniach, powyżej 60% przeciwciał wykazuje wysoką awidność [56]. Tak więc metoda ta służy do różnicowania zakażenia pierwotnego i wtórnego oraz rozstrzygania w sytuacjach związanych z długotrwałym utrzymywaniem się IgM oraz fałszywie dodatnimi wynikami oznaczeń anty CMV IgM.

8.2. Badanie płynu owodniowego

W przypadku potwierdzenia zakażenia pierwotnego u matki na podstawie obecności anty-CMV IgM oraz anty-CMV IgG o niskiej awidności, zachodzi podejrzenie zakażenia płodu. Badaniem z wyboru w tej sytuacji jest oznaczanie obecności wirusa w płynie owodniowym (AF – *amniotic fluid*). Płyn owodniowy do badań diagnostycznych w kierunku CMV powinien być pobrany między 21 a 22 tygodniem ciąży, ale co najmniej 6 tygodni po zakażeniu matki [53]. Wynika to z faktu, że po pierwsze, nerki u płodu zaczynają efektywnie produkować mocz po 21 tygodniu trwania ciąży, a po drugie, wirus jest wydalany z moczem płodu na wykrywalnym poziomie po upływie 6–9 tygodni od zakażenia ciężarnej [9]. Z AF można próbować dokonać izolacji wirusa w hodowlach komórkowych, jednak obecnie powszechniej stosuje się oznaczanie obecności materiału genetycznego CMV metodą PCR. Co do wartości diagnostycznej określania poziomu CMV DNA (*viral load*) i prognozowania na tej podstawie o przebiegu zakażenia u płodu i jego konsekwencjach istnieją znaczne kontrowersje. W badaniach Lazzarotto i wsp. [53, 54] wykazano, że stwierdze-

nie obecności DNA CMV na poziomie > 10^3 kopii/ml w 100% wskazuje na istnienie zakażenia wrodzonego, ale dopiero poziom DNA CMV > 10^5 kopii/ml związany jest z wysokim ryzykiem urodzenia dziecka z objawami zakażenia, natomiast obecność < 500 kopii/ml z dużym prawdopodobieństwem wyklucza wystąpienie objawowego zakażenia u dziecka. W innych badaniach nie wykazano wyraźnej korelacji pomiędzy liczbą kopii DNA CMV w płynie owodniowym a konsekwencjami zakażenia u płodu [34, 35, 77, 78].

8.3. USG

Pomocną metodą wykrywania zakażeń wrodzonych CMV jest rutynowo wykonywane w czasie ciąży badanie USG. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego powinno być wykonywane trzykrotnie: około 12, 20 i 30 tygodnia ciąży. Opisano wiele zmian widocznych w badaniu USG, które mogą być związane z zakażeniem CMV: zahamowanie wzrostu płodu, małomózgowie, powiększenie komór mózgu, zwapnienia okołokomorowe, echogeniczność jelit, wielowodzie, obrzęk płodu, wysięk opłucnowy, powiększenie łożyska [39]. W przypadku, gdy nie prowadzony jest program badań przesiewowych, stwierdzenie takich zmian podczas rutynowego badania USG powinno być przesłanką do podjęcia badań mających na celu potwierdzenie bądź wykluczenie zakażenia wrodzonego CMV. Zaznaczyć należy, że stwierdzone zmiany niekoniecznie muszą być skutkiem zakażenia CMV, a z drugiej strony wiadomo, że czułość USG w diagnozie zakażenia CMV jest stosunkowo niska i opisane zmiany stwierdzane są jedynie w 8,5–14,9% zakażeń pierwotnych u matki [39].

8.4. Diagnostyka zakażenia wrodzonego u noworodka

Przy diagnozowaniu zakażenia wrodzonego CMV u noworodka sprawą niezwykle istotną jest wybór odpowiedniej metody diagnostycznej. Od lat 60-tych testem diagnostycznym uważanym za złoty standard w diagnozowaniu tego typu zakażenia u noworodków była izolacja wirusa z moczu [26]. Nadal izolacja wirusa cytomegalii z moczu lub śliny noworodka w 2 pierwszych tygodniach życia pozostaje standardową procedurą w niektórych ośrodkach [52, 53]. Jednakże izolacja CMV w hodowli komórkowej jest metodą czasochłonną (wymagającą nawet do 6 tygodni inkubacji w hodowli) i wymagającą wykwalifikowanego personelu do oceny. W chwili obecnej szybkie metody molekularne, takie jak PCR, zastępują metodę izolacji wirusa, także w przypadku CMV. Wykrywanie DNA CMV metodą PCR, we krwi noworodka pobranej w czasie porodu, wydaje się być czułą i swoistą metodą diagnozowania zakażenia wrodzonego [50], coraz częściej zastępującą izolację CMV [53]. Również mocz i ślina zakażonego dziecka zawierają dużą liczbę cząstek CMV, a tym samym kopii DNA, pozwalającą na przeprowadzenie czułej reakcji PCR [98]. Dane uzyskane w ilościowej reakcji PCR (ustalenie tzw. *viral load*) mogą mieć wartość prognostyczną w określaniu następstw zakażenia wrodzonego [12]. Wykrycie swoistych dla CMV przeciwciał w klasie IgM w surowicy noworodka, krótko po porodzie, również potwierdza zakażenie wrodzone, ale przeciwciała w tej klasie są obecne tylko u 20–70% zakażonych dzieci [76] i dlatego otrzymanie negatywnego wyniku w badaniu serologicznym nie wyklucza zakażenia CMV.

Po upływie 2–3 tygodni od urodzenia rozróżnienie za pomocą testów wirusologicznych i serologicznych zakażenia wewnątrzmacicznego od okołoporodowego staje się niemożliwe, a rozpoznanie zakażenia wrodzonego może się opierać tylko na objawach klinicznych [53].

Problem diagnostyczny pojawia się również w przypadku dzieci, które rodzą się bez objawów klinicznych zakażenia. Jedynie wprowadzenie rutynowych badań skryningowych u noworodków mogłoby pozwolić na wykrycie wszystkich przypadków dzieci z zakażeniem wrodzonym CMV i zapewnić możliwość ich dalszego monitorowania [26].

9. Profilaktyka i leczenie

9.1. Szczepionka

Duże nadzieje pokładane są w możliwości kontroli zakażenia CMV na drodze szczepień [8]. Jeśli chodzi o problem zakażeń wrodzonych to oczekuje się, że szczepienie powinno chronić przed transmisją wirusa w ciąży (immunizacja kobiet w wieku rozrodczym i 12-letnich dziewcząt). Oczekuje się również pozytywnych efektów poprzez zmniejszenie poziomu transmisji wśród dzieci w żłobkach i przedszkolach oraz zmniejszenie poziomu transmisji dziecko-dorosły (powszechne szczepienie niemowląt i dzieci) [81].

Idealna szczepionka powinna stymulować zarówno odpowiedź humoralną w zakresie produkcji przeciwciał neutralizujących (NT-Abs), jak i komórkową w zakresie odpowiedzi ze strony cytotoksycznych (CTL) i pomocniczych (Th) limfocytów. Jednak pomimo badań rozpoczętych już w latach 60-tych ubiegłego wieku, do tej pory nie udało się opracować skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko wirusowi cytomegalii. Pierwsze podjęte próby dotyczyły użycia atenuowanych szczepów CMV. Jakkolwiek szczepionka atenuowana, opracowana na bazie szczepu Town, wykazała obniżenie ryzyka wystąpienia objawowej formy zakażenia u biorców przeszczepu nerki, to jej słaba immunogenność u zdrowych osób seronegatywnych wykluczyła celowość jej stosowania w profilaktyce zakażeń wrodzonych [2]. Innym rodzajem szczepionki, z którą wiązane są duże nadzieje, to szczepionka podjednostkowa zawierająca glikoproteinę/y powierzchniowe wirusa (gB, gH).

Preparaty te wykazują immunogenność pod względem stymulacji NT-Abs i jako, że nie zawierają zdolnego do replikacji wirusa, są bezpieczne. Stwierdzono jednak, że niedostatecznie stymulują odpowiedź ze strony CTL, a poziom przeciwciał uzyskanych w wyniku szczepienia szybko ulega obniżeniu, co jest typowe dla tego rodzaju preparatów. Niedawno opublikowane dane wskazują, że zastosowanie adjuwantu MF59 (emulsji zawierającej skwalen) znacznie poprawia immunogenność podjednostkowej szczepionki gB, co stwarza nadzieję na uzyskanie możliwości kontroli zakażeń wrodzonych CMV [72, 73]. Liczną grupę preparatów, dla których były, bądź są nadal podejmowane badania to szczepionki wektorowe z użyciem wirusa ospy kanarków (ALVAC-gB, ALVAC-pp65), wirusa ospy wielbłądów (MVA-gB, MVA-pp65, MVA-IE1), wirusa wenezuelskiego zapalenia mózgu (VEE-gB, pp65, IE1), adenowirusa (Ad-gB, IE1). Inne kierunki badań obejmują prace nad immunizacją plazmidami dającymi ekspresję białek odpowiedzialnych za stymulację CTL i NT-Abs (szczepionki DNA), wykorzystaniem syntetycznych peptydów pp65 z epitopami immunodominującymi dla CTL (szczepionki peptydowe), czy wykorzystanie niekompletnych cząstek wirusowych (*Dense bodies*) [81].

Jakkolwiek zaawansowanie prac jest wysokie, a ich wyniki budzą nadzieję, to biorąc pod uwagę doświadczenia zdobyte po zatwierdzeniu do stosowania szczepionki przeciwko wirusowi ospy wietrznej i półpaśca, jedynemu do tej pory herpeswirusowi, dla którego to się udało, to problematycznym pozostaje fakt, czy uzyskanie preparatu zdolnego do stymulacji odporności „sterylizującej" w przypadku CMV będzie kiedykolwiek możliwe.

9.2. Bierna immunizacja

W profilaktyce zakażeń wrodzonych CMV stosowana jest bierna immunizacja. Mechanizm działania preparatów zawierających wysokie poziomy przeciwciał – HIG (*Hyper-Immune Globulin*) obejmuje takie procesy jak: neutralizacja cząstek wirusowych, podwyższenie aktywności komórek NK, zależną od przeciwciał cytotoksyczność, blokowanie procesu przyłączania wirusa [44].

W badaniach N i g r o i wsp. [67] wykazano, że podawanie immunoglobuliny kobietom, u których zdiagnozowano pierwotne zakażenie CMV zmniejszało ryzyko infekcji płodu. Porównano odsetek noworodków z potwierdzonym laboratoryjnie zakażeniem wrodzonym w dwóch grupach kobiet. W grupie pierwszej kobietom, aż do momentu rozwiązania podawano immunoglobulinę, w drugiej nie stosowano tej formy terapii. Ostatecznie zakażenia wrodzone stwierdzono u 16% noworodków w grupie pierwszej i 56% w grupie drugiej [67].

Uważa się, że podawanie HIG wywiera korzystny wpływ w sposób bezpośredni w wyniku przedostania się przeciwciał do krążenia płodu [82] oraz pośrednio poprzez redukcje zgrubienia łożyska, co poprawia jego funkcję odżywcze w stosunku do płodu [48, 68].

Wydaje się więc, że podawanie immunoglobuliny kobietom w ciąży, u których wykryto pierwotne zakażenie, może być skuteczną metodą w zapobieganiu zakażeń wrodzonych u noworodków. Przemawia za tym dostępność tej metody, brak toksyczności oraz niewielkie koszty w porównaniu do tych ponoszonych w przypadku leczenia dzieci z objawowymi zakażeniami wrodzonymi [18, 44].

9.3. Leki przeciwwirusowe

Obecnie zarejestrowane są cztery leki przeciwwirusowe przeznaczone do leczenia zakażeń wywoływanych przez wirus cytomegalii: ganciclovir (GCV), valganciclovir (VGCV), cidofovir (CDV) i foscarnet (PFA), przy czym lekiem z wyboru jest ganciclovir, a foscarnet najczęściej stosuje się w przypadku zakażeń CMV opornych na GCV. Ganciclovir jest acyklicznym analogiem deoksyguanozyny, który do uzyskania pełnej aktywności przeciwwirusowej wymaga fosforylacji do trójfosforanowej pochodnej. W pierwszym, wstępnym etapie fosforylacji GCV jest selektywnie fosforylowany do monofosforanu przez kodowaną przez wirusa cytomegalii kinazę fosforanową (pUL97) [83]. Pozostałe etapy fosforylacji są katalizowane przez indukowane CMV kinazy komórkowe. Trójfosforanowa forma gancicloviru swoiście hamuje działanie wirusowej polimerazy, jak również po wbudowaniu do nowotworzonego łańcucha DNA wirusa powoduje terminację jego syntezy, a tym samym blokuje replikację wirusa w zakażonej komórce [42, 75]. Ze względu na niską przyswajalność formy doustnej ganciclovir podawany jest dożylnie. Pochodna gancicloviru – valganciclovir – jako preparat stosowany w formie doustnej charakteryzuje się 10-krotnie wyższą przyswajalnością [46]. Działanie cidofoviru i foscarnetu opiera się na zahamowaniu działania polimerazy DNA wirusa. Cidofovir, podobnie jak ganciclovir, wymaga fosforylacji, ale tylko przez kinazy komórkowe. Jego spektrum działania jest bardzo szerokie i obejmuje liczne wirusy DNA – herpeswirusy, adenowirusy, orthopoxwirusy [23]. Mechanizm działania foscarnetu (analogu pirofosforanowego) nie jest uzależniony od procesu fosforylacji i polega na wybiórczym i odwracalnym hamowaniu polimerazy DNA wirusa poprzez blokowanie miejsc wiązania pirofosforanu [42]. Związek ten jest stosowany przy leczeniu opornych na GCV zakażeń CMV, aczkolwiek jego toksyczność w znacznym stopniu ogranicza jego stosowanie [17, 96].

Stosowanie terapii przeciwwirusowej w przypadku zakażeń wrodzonych CMV jest przedmiotem intensywnych badań w wielu krajach [45, 46, 49, 57, 65]. Wyniki tych badań, prowadzonych z reguły na niewielkich gru-

pach dzieci wskazują na ograniczoną skuteczność stosowania preparatów przeciwwirusowych bądź jej brak. W chwili obecnej wydaje się, że głównym wskazaniem do stosowania chemioterapeutyków w przypadku zakażeń wrodzonych CMV jest zapobieganie, stabilizacja i poprawa niedosłuchu u dzieci [62].

Wyniki badań wskazują również na bardzo delikatną równowagę, która istnieje pomiędzy spodziewaną korzyścią terapeutyczną, a zwiększoną toksycznością leku, szczególnie przy leczeniu noworodków i niemowląt [61]. Stosowanie terapii przeciwwirusowej w zakażeniach wrodzonych CMV ma swoje ograniczenia. Głównym z nich jest fakt, że większość uszkodzeń OUN związanych z zakażeniem CMV ujawnia się w okresie życia płodowego, zanim pojawi się możliwość rozpoznania choroby i wdrożenia leczenia. Ponadto, stosując terapię ganciclovirem należy wziąć pod uwagę jego potencjalną toksyczność (neutropenia), jak również ryzyko wystąpienia komplikacji przy długotrwałej terapii oraz konieczność długofalowego monitorowania pod kątem efektów ubocznych dzieci poddanych leczeniu [42, 65]. Problem stanowi również terapia przeciwwirusowa u noworodków z zakażeniem wrodzonym CMV, urodzonych bez klinicznych objawów zakażenia, u których istnieje niebezpieczeństwo wystąpienia późnych następstw zakażenia [21]. Istotnym ograniczeniem terapii jest pojawiająca się oporność na stosowane leki, aczkolwiek należy zauważyć, że problem ten w mniejszym stopniu dotyczy leczenia zakażeń wrodzonych CMV w porównaniu do terapii u biorców przeszczepów [11, 29].

Badania nad opracowaniem nowych preparatów przeciwwirusowych skutecznych w leczeniu zakażeń CMV koncentrują się na otrzymaniu leku o wysokiej skuteczności, który charakteryzowałby się niską toksycznością, co jest szczególnie istotne w przypadku leczenia osób o obniżonej odporności oraz noworodków, niemowląt i dzieci [60, 75].

9.4. Zapobieganie zakażeniom CMV

Brak szczepionki oraz ograniczona możliwość zastosowania terapii przeciwwirusowej u noworodków, niemowląt i kobiet w ciąży sprawia, że istotnym elementem profilaktyki stają się działania zapobiegawcze mające na celu ograniczenie szerzenia się zakażenia CMV, które można podjąć zarówno w domu, jak i w miejscu pracy. Istotną sprawą, w przypadku kobiet w ciąży, jest znajomość statusu serologicznego związanego z zakażeniem CMV [55], a w przypadku kobiet seronegatywnych – odpowiednia edukacja w zakresie możliwości ustrzeżenia się zakażenia (zakażenie pierwotne) [14, 25, 80, 97]. Jest to szczególnie istotne w przypadku kobiet opiekujących się małymi dziećmi, a więc kobiet z grupy wysokiego ryzyka zakażenia. Zalecenia dla seronegatywnych kobiet w ciąży przedstawiono w Tabeli I. Istotną rolę w edukacji kobiet w ciąży na temat ryzyka jakie niesie ze sobą zakażenie wirusem cytomegalii oraz postępowania mającego na celu uniknięcie tego zakażenia powinni odgrywać lekarze ginekolodzy i położnicy. Badania ankietowe przeprowadzone przez zespół R o s s i wsp. z CDC [79] w 2009 roku wśród członków Amerykańskiego Kolegium Położników i Ginekologów (ACOG) wykazały, że na 305 lekarzy mniej niż 50% udziela pacjentkom porad na temat zapobiegania zakażeniom CMV, tłumacząc to ograniczeniami czasowymi [79]. Badania na temat wiedzy dotyczącej zakażenia wrodzonego wśród lekarzy w Holandii, szczególnie pediatrów, lekarzy położników i ginekologów przeprowadzili

Tabela I

Zalecenia dla seronegatywnych kobiet w ciąży, mające na celu zmniejszenie ryzyka zakażeń wrodzonych (wg A d l e r i wsp. [1, 6])

NALEŻY:
1. przyjąć, że wszystkie dzieci poniżej 3 roku życia są potencjalnym źródłem transmisji CMV
2. dokładnie myć ręce mydłem i ciepłą wodą po następujących czynnościach: – zmiana pieluchy – przebieranie dziecka – karmienie – kąpiel – wycieranie śliny lub wydzieliny z nosa – dotykanie zabawek, smoczków, szczoteczki do zębów
3. myć i dezynfekować zabawki
4. przestrzegać ustalonych procedur higienicznych w miejscu pracy
NIE NALEŻY: – używać tych samych naczyń – dzielić się jedzeniem – całować dziecko w usta lub ich pobliżu – używać wspólnych ręczników – spać w tym samym łóżku

Korver i wsp. [47]. Analiza wyników ujawniła, że większość lekarzy zaangażowanych w opiekę nad matką i dzieckiem nie posiada optymalnej wiedzy na temat zakażenia wrodzonego CMV, w tym w zakresie transmisji zakażenia CMV i zapobiegania mu [47]. Podobnych badań w Polsce nie prowadzono.

Stan wiedzy i świadomości na temat zakażenia wrodzonego CMV w 7 grupach kobiet z różnych regionów geograficznych USA badali Jeon i wsp. [43]. Spośród 643 badanych kobiet tylko 142 (22%) słyszało cokolwiek o zakażeniu wrodzonym CMV, a wśród nich 78 wskazało częste mycie rąk jako działanie zapobiegające rozprzestrzenianiu się zakażenia [43]. Badanie przeprowadzone we Francji przez Cordier i wsp. [20] wśród 362 hospitalizowanych kobiet ciężarnych wykazały, że 217/362 (60%) kobiet słyszało o zakażeniu wrodzonym CMV. Jednak w grupie tej dużo więcej kobiet wiedziało na temat niebezpieczeństw związanych z toksoplazmozą (ponad 95%), różyczką (ponad 90%), zakażeniem matki HIV (99%). Ponadto, w grupie 217 kobiet, które słyszały o zakażeniu wrodzonym CMV większość (92%) wiedziała, że częste mycie rąk może zredukować ryzyko transmisji zakażenia, a 187 kobiet (86%) wiedziało, że używanie wspólnych naczyń, bielizny i dzielenie się jedzeniem zwiększa ryzyko nabycia zakażenia. Średnio 72% świadomych ryzyka ciężarnych znało podstawowe zasady higieny, których należy przestrzegać, aby zmniejszyć ryzyko nabycia zakażenia CMV [20].

10. Podsumowanie

Problem zakażeń wrodzonych CMV przypomina „słonia w salonie, którego nikt nie zauważa" jak obrazowo wyraziła się Demmler [24], opisując sytuację w USA. Sytuacja w Polsce jest podobna do tej obserwowanej na całym świecie i charakteryzuje ją niska świadomość społeczna dotycząca ryzyka i powikłań związanych z zakażeniami wewnątrzmacicznymi CMV oraz możliwości zapobiegania im.

Biorąc pod uwagę fakt, że wirus cytomegalii jest najczęstszą przyczyną zakażeń wrodzonych tak w Polsce, jak i na świecie, a uzyskanie przełomu w tym zakresie będzie możliwe dopiero za sprawą skutecznej szczepionki – niezwykle ważne wydaje się prowadzenie akcji podnoszących świadomość wśród kobiet w wieku rozrodczym na temat problemów związanych z zakażeniem CMV.

Piśmiennictwo

1. Adler S.P., Finney J.W., Manganello A.M., Best A.M.: Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J. Pediatr.* **145**, 485–491 (2004)
2. Adler S.P., Hempfling S.H., Starr S.E., Plotkin S.A., Riddell S.: Safety and immunogenicity of Ttowne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr. Infect. Dis.* **17**, 200–206 (1998)
3. Adler S.P.: Cytomegalovirus and child day care: risk factors for maternal infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **10**, 590–594 (1991)
4. Adler S.P.: Cytomegalovirus transmission and child day care. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* **7**, 109–122 (1992)
5. Adler S.P.: Molecular epidemiology of cytomegalovirus: a study of factors affecting transmission among children at three day--care centers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **10**, 584–590 (1991)
6. Adler S.P.: Screening for cytomegalovirus during pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* Article ID 942937, 9 pages, doi:10.1155/2011/942937 (2011)
7. Arcenas R., Widen R.H.: Epstein-Barr virus reactivation after superinfection of the BJAB-B1 and P3HR-1 cell lines with cytomegalovirus. *BMC Microbiol.* **23**, 2–20 (2002)
8. Arvin A.M., Fast P., Myers M., Plotkin S., Rabinovich R.: Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 233–239 (2004)
9. Bodéus M., Hubinont C., Bernard P., Bouckaert A., Thomas K., Goubau P.: Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat. Diagn.* **19**, 314–317 (1999)
10. Bodéus M., Kabamba-Mukadi B., Zech F., Hubinont C., Bernard P., Goubau P.: Human cytomegalovirus in utero transmission: follow-up of 524 maternal seroconversions. *J. Clin. Virol.* **47**, 201–202 (2010)
11. Boivin G., Goyette N., Rollag H., Jardine A.G., Pescovitz M.D., Asberg A., Ives J., Hartmann A., Humar A.: Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir. Ther.* **14**, 697–704 (2009)
12. Boppana S.B., Fowler K.B., Pass R.F., Rivera L.B., Bradford R.D., Lakeman F.D., Britt W.J.: Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J. Pediatr.* **146**, 817–823 (2005)
13. Boppana S.B., Rivera L.B., Fowler K.B., Mach M., Britt W.J.: Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1366–1371 (2001)
14. Cannon M.J., Davis K.F.: Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health,* **5**, 70 (2005)
15. Casarosa P., Waldhoer M., LiWang P.J., Vischer H.F., Kledal T., Timmerman H., Schwartz T.W., Smit M.J., Leurs R.: CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor. *Biol. Chem.* **280**, 3275–3285 (2005)
16. Chan G., Nogalski M.T., Yurochko A.D.: Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 22369–22374 (2009)
17. Chou S.: Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev. Med. Virol.* **18**, 233–246 (2008)
18. Clark A.L., Gall S.A.: Clinical uses of intravenous immunoglobulin in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **176**, 241–253 (1997)
19. Coaquette A., Bourgeois A., Dirand C., Varin A., Chen W., Herbein G.: Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 155–161 (2004)
20. Cordier A.G., Guitton S., Vauloup-Fellous C., Grangeot-Keros L., Ayoubi J.M., Benachi A., Picone O.: Awareness of cytomegalovirus infection among pregnant women in France. *J. Clin. Virol.* **53**, 332–337 (2012)
21. Dahle A.J., Fowler K.B., Wright J.D., Boppana S.B., Britt W.J., Pass R.F.: Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J. Am. Acad. Audiol.* **11**, 283–290 (2000)

22. Dankner W.M., McCutchan I.A., Richman D.D., Hirata K., Spector S.A.: Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* **161**, 31–36 (1990)
23. De Clercq E., Holý A.: Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 928–940 (2005)
24. Demmler G.J.. Cytomegalovirus infection: back to the future or no more elephants? *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1152–1153 (2006)
25. Demmler-Harrison G.J.: Congenital cytomegalovirus: Public health action towards awareness, prevention, and treatment. *J. Clin. Virol.* **46**, Suppl. 4, S1–5 (2009)
26. Dollard S.C., Schleiss M.R., Grosse S.D.: Public health and laboratory considerations regarding newborn screening for congenital cytomegalovirus. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, Suppl. 2, S249–254 (2010)
27. Dworsky M.E., Welch K., Cassady G., Stagno S.: Occupational risk for primary cytomegalovirus infection among pediatric health-care workers. *N. Engl. J. Med.* **309**, 950–953 (1983)
28. Dworsky M.E., Yow M., Stagno S., Pass R.F., Alford C.: Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics,* **72**, 295–299 (1983)
29. Emery V.C., Griffiths P.D.: Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **97**, 8039–8044 (2000)
30. Feire A.L., Koss H., Compton T.: Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15470–15475 (2004)
31. Forsgren M.: Prevention of congenital and perinatal infections. *Euro. Surveill.* **14**, 2–4 (2009)
32. Fowler K.B., Boppana S.B.: Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J. Clin. Virol.* **35**, 226–231 (2006)
33. Gibson W.: Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**, 187–204 (2008)
34. Goegebuer T., Van Meensel B., Beuselinck K., Cossey V., Van Ranst M., Hanssens M., Lagrou K.: Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 660–665 (2009)
35. Gouarin S., Gault E., Vabret A., Cointe D., Rozenberg F., Grangeot-Keros L., Barjot P., Garbarg-Chenon A., Lebon P., Freymuth F.: Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1767–1772 (2002)
36. Grant S., Edmond E., Syme J.: A prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy. I. Laboratory evidence of congenital infection following maternal primary and reactivated infection. *J. Infect.* **3**, 24–31 (1981)
37. Griffiths P.D., Baboonian C.: Intra-uterine transmission of cytomegalovirus in women known to be immune before conception. *J. Hyg. (Lond).* **92**, 89–95 (1984)
38. Griffiths P.D., Cytomegalovirus (w) Principles and practice of clinical virology. 5th edition, red. A.J. Zuckerman, J.E. Banatvala, J.R. Pattison, P.D. Griffiths, John Wiley & Sons Ltd. London, 2004, s. 85–122
39. Guerra B., Simonazzi G., Puccetti C., Lanari M., Farina A., Lazzarotto T., Rizzo N.: Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **198**, 380–387 (2008)
40. Hamprecht K., Maschmann J., Müller D., Dietz K., Besenthal I., Goelz R., Middeldorp J.M., Speer C.P., Jahn G.: Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr. Res.* **56**, 529–535 (2004)
41. Hummel M., Abecassis M.M.: A model for reactivation of CMV from latency. *J. Clin. Virol.* **25**, Suppl. 2, S123–136 (2002)
42. James S.H., Kimberlin D.W., Whitley R.J.: Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections: neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection. *Antiviral. Res.* **83**, 207–213 (2009)
43. Jeon J., Cannon M.J. i wsp.: Knowledge and awareness of congenital cytomegalovirus among women. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2006**, 1–7 (2006)
44. Keller M.A., Stiehm E.R.: Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 602–614 (2000)
45. Kimberlin D.W., Whitley R.J. i wsp.: Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J. Pediatr.* **143**, 16–25 (2003)
46. Kimberlin D.W., Whitley R.J. i wsp.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J. Infect. Dis.* **197**, 836–845 (2008)
47. Korver A.M., de Vries J.J., de Jong J.W., Dekker F.W., Vossen A.C., Oudesluys-Murphy A.M.: Awareness of congenital cytomegalovirus among doctors in the Netherlands. *J. Clin. Virol.* **46**, Suppl. 4, S11–15 (2009)
48. La Torre R., Nigro G., Mazzocco M., Best A.M., Adler S.P.: Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 994–1000 (2006)
49. Lackner A., Acham A., Alborno T., Moser M., Engele H., Raggam R.B., Halwachs-Baumann G., Kapitan M., Walch C.: Effect on hearing of ganciclovir therapy for asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: four to 10 year follow up. *J. Laryngol. Otol.* **123**, 391–396 (2009)
50. Lanari M., Lazzarotto T., Venturi V., Papa I., Gabrielli L., Guerra B., Landini M.P., Faldella G.: Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics,* **117**, 76–83 (2006)
51. Lazzarotto T., Brojanac S., Maine G.T., Landini M.P.: Search for cytomegalovirus-specific immunoglobulin M: comparison between a new western blot, conventional western blot, and nine commercially available assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**, 483–486 (1997)
52. Lazzarotto T., Guerra B., Gabrielli L., Lanari M., Landini M.P.: Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1285–1293 (2011)
53. Lazzarotto T., Guerra B., Lanari M., Gabrielli L., Landini M.P.: New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol.* **41**, 192–197 (2008)
54. Lazzarotto T., Guerra B., Quarta S., Lanari M., Bovicelli L., Nicolosi A., Landini M.P.: Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **183**, 476–482 (2000)
55. Lazzarotto T., Lanari M.: Why is cytomegalovirus the most frequent cause of congenital infection? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **9**, 841–843 (2011)
56. Lazzarotto T., Spezzacatena P., Varani S., Gabrielli L., Pradelli P., Guerra B., Landini M.P.: Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 127–129 (1999)
57. Lombardi G., Garofoli F., Stronati M.: Congenital cytomegalovirus infection: treatment, sequelae and follow-up. *J. Matern. Neonatal Med.* **23**, Suppl. 3, S45–48 (2010)
58. Ludwig A., Hengel H.: Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill.* **14**, 26–32 (2009)

59. Maidji E., Pereira L. i wsp.: Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am. J. Pathol.* **177**, 1298–1310 (2010)
60. Marschall M., Stamminger T.: Molecular targets for antiviral therapy of cytomegalovirus infections. *Future Microbiol.* **4**, 731–742 (2009)
61. Marshall B.C., Koch W.C.: Antivirals for cytomegalovirus infection in neonates and infants: focus on pharmacokinetics, formulations, dosing, and adverse events. *Paediatr. Drugs.* **11**, 309–321 (2009)
62. Milewska-Bobula B., Lipka B.: Congenital cytomegaly-advances in diagnosis and therapy. *Przegl. Epidemiol.* **63**, 79–83 (2009)
63. Mocarski E.S., Courcelle C.T., Cytomegaloviruses and their replication (w) Fields Virology, red. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, s. 2629–2673
64. Munro S.C., Hall B., Whybin L.R., Leader L., Robertson P., Maine G.T., Rawlinson W.D.: Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4713–4718 (2005)
65. Nassetta L., Kimberlin D., Whitley R.: Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 862–867 (2009)
66. Nelson C.T., Demmler G.J.: Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clin. Perinatol.* **24**, 151–160 (1997)
67. Nigro G., Adler S.P., La Torre R., Best A.M.: Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* **353,** 1350–1362 (2005)
68. Nigro G., Torre R.L., Pentimalli H., Taverna P., Lituania M., de Tejada B.M., Adler S.P.: Regression of fetal cerebral abnormalities by primary cytomegalovirus infection following hyperimmunoglobulin therapy. *Prenat. Diagn.* **28**, 512–517 (2008)
69. Nyholm J.L., Schleiss M.R.: Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. *Int. J. Womens Health,* **9**, 23–35 (2010)
70. Ornoy A., Diav-Citrin O.: Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod. Toxicol.* **21**, 399–409 (2006)
71. Pass R.F., Hutto C., Lyon M.D., Cloud G.: Increased rate of cytomegalovirus infection among day care center workers. Pediatr. *Infect Dis. J.* **9**, 465–470 (1990)
72. Pass R.F., Cloud G. i wsp.: Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1191–1199 (2009)
73. Pass R.F.: Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *J. Clin. Virol.* **46**, Suppl.,4, S73–76 (2009)
74. Powers C., DeFilippis V., Malouli D., Früh K.: Cytomegalovirus immune evasion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**, 333–359 (2008)
75. Prichard M.N., Kern E.R.: The search for new therapies for human cytomegalovirus infections. *Virus Res.* **157**, 212–221 (2011)
76. Revello M.G., Gerna G.: Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 680–715 (2002)
77. Revello M.G., Gerna G.: Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol.* **29**, 71–83 (2004)
78. Revello M.G., Zavattoni M., Furione M., Baldanti F., Gerna G.: Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3350–3352 (1999)
79. Ross D.S., Rasmussen S.A., Cannon M.J., Anderson B., Kilker K., Tumpey A., Schulkin J., Jones J.L.: Obstetrician/gynecologists' knowledge, attitudes, and practices regarding prevention of infections in pregnancy. *J. Womens Health* (*Larchmt*), **18**, 1187–1193 (2009)
80. Ross D.S., Victor M., Sumartojo E., Cannon M.J.: Women's knowledge of congenital cytomegalovirus: results from the 2005 HealthStyles survey. *J. Womens Health* (*Larchmt*), **17**, 849–858 (2008)
81. Schleiss M.R.: Cytomegalovirus vaccine development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**, 361–382 (2008)
82. Schleiss M.R.: The role of the placenta in the pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: is the benefit of cytomegalovirus immune globulin for the newborn mediated through improved placental health and function? *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1001–1003 (2006)
83. Sharland M., Luck S., Griffiths P., Cotton M.: Antiviral therapy of CMV disease in children. *Adv. Exp. Med. Biol.* **697**, 243–260 (2011)
84. Sinclair J., Sissons P.: Latency and reactivation of HCMV. *J. Gen. Virol.* 87, 1763–1779 (2006)
85. Sinzger C., Jahn G.: Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology,* **39**, 302–319 (1996)
86. Slobedman B., Mocarski E.S.: Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**, 4806–4812 (1999)
87. Stagno S., Pass R.F, Dworsky M.E., Alford C.A.: Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin. Obstet. Gynecol.* **25**, 563–576 (1982)
88. Stagno S., Pass R.F., Cloud G., Britt W.J., Henderson R.E., Walton P.D., Veren D.A., Page F., Alford C.A.: Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA,* **256**, 1904–1908 (1986)
89. Stagno S., Reynold D.W., Pass R.F., Alford C.A.: Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* **302**, 1073–1076 (1980)
90. Stagno S.: Breastfeeding and the transmission of cytomegalovirus infections. *Ital. J. Pediatr.* **28**, 275–280 (2002)
91. Staras S.A., Dollard S.C., Radford K.W., Flanders W.D., Pass R.F., Cannon M.J.: Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988–1994. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1143–1151 (2006)
92. Stinski M. F., Isomura H.: Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med. Microbiol. Immunol.* 197, 223–231 (2008)
93. Stinski M.F., Cytomegalovirus and its replication (w) Virology. 2nd edition, red. B.N. Fields, D.M. Knipe, Raven Press, New York,1990, s. 1959–1980
94. Sweet C.: The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 457–482 (1999)
95. Sylwester A.W., Picker L.J. i wsp.: Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* **202**, 673–685 (2005)
96. Torres-Madriz G., Boucher H.W.: Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 702–711 (2008)
97. Vauloup-Fellous C., Picone O., Cordier A.G., Parent-du-Châtelet I., Senat M.V., Frydman R., Grangeot-Keros L.: Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J. Clin. Virol.* **46**, Suppl. 4, S49–53 (2009)
98. Yamamoto A.Y., Mussi-Pinhata M.M., Marin L.J., Brito R.M., Oliveira P.F., Coelho T.B.: Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J. Clin. Virol.* **36**, 228–230 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 29–40
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNE OGNIWA PALIWOWE: PODSTAWY TECHNOLOGII, JEJ OGRANICZENIA I POTENCJALNE ZASTOSOWANIA

Katarzyna Markowska[1]*, Anna Maria Grudniak[1], Krystyna Izabella Wolska[1]

[1] Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wpłynęło w czerwu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Zasada działania i rodzaje MFC. 3. Mikroorganizmy wytwarzające elektryczność. 4. Transfer elektronów na anodę. 5. Wydajność pracy MFC. 6. Optymalizacja pracy ogniwa. 7. Wykorzystanie ogniw mikrobiologicznych. 8. Podsumowanie

Microbial fuel cells: rationale, limitations and potential applications of the technology

Abstract: Microbial fuel cells (MFC) are devices which use electrochemically active microorganisms to generate an electrical current from a wide range of substrates. Because of the promise of sustainable energy production from organic wastes and wastewaters, this technology is of interest to many scientists. This article deseribes to rationale and limitations of this technology. The performance of MFC depends on a complex system of parameters. Apart from technical variables like the fuel cell design, mechanisms of the bioelectrochemical energy conversion decisively determine the MFC power and energy output. Current limitations make this technology inefficient in electricity generation. Therefore some researchers focus ori the ability of electrochemically active microorganisms to degrade wastes and toxic chemicals as their greatest value. Still continuous efforts are exerted to optimize performance. This article presents the most interesting current and potential applications of microbial fuel cells are highlighted.

1. Introduction. 2. The principle of operation and types of MFC. 3. Microorganisms that produce electricity. 4. Electron transfer to the anode. 5. MFC work efficiency. 6. Optimization of the fuel cells. 7. Application of MFC. 8. Summary

Słowa kluczowe: elektryczność, mikrobiologiczne ogniwo paliwowe (MFC), mikroorganizmy aktywne elektrochemicznie, zewnątrzkomórkowy transfer elektronów
Key words: electricity, electrochemically active microorganisms, extracellular electron transfer, microbial fuel cell (MFC)

1. Wstęp

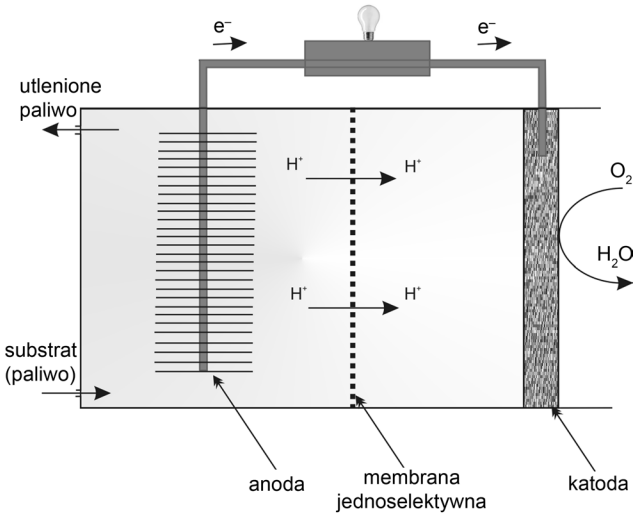
W obliczu wciąż wzrastającego zapotrzebowania na energię elektryczną i szybko zmniejszających się zasobów paliw kopalnych, wyzwaniem dla ludzkości staje się konieczność poszukiwania źródeł energii, które są zarówno neutralne wobec efektu cieplarnianego, jak i odnawialne. Od wielu lat obserwuje się wzmożone zainteresowanie badaczy rozwiązaniem, które umożliwia pozyskanie zarówno energii jak i surowców z odpadów ciekłych na drodze biokonwersji. Takim rozwiązaniem mogą być mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC, *Microbial Fuel Cells*), które pozwalają na bezpośrednią produkcję energii z surowców biodegradowalnych, zazwyczaj zredukowanych, z wykorzystaniem komórek bakterii lub grzybów [56]. Jak wiadomo, w ściekach zgromadzona jest energia w ilości dziewięciokrotnie przekraczającej tę potrzebną do ich utylizacji metodami konwencjonalnymi, a ogniwa mikrobiologiczne są właśnie technologią umożliwiającą wykorzystanie tego potencjału [15].

Pomysł zastosowania mikroorganizmów jako biokatalizatorów w ogniwach paliwowych nie jest nowy, datuje się go na ponad 100 lat, a badania w tej dziedzinie prowadzono już stosunkowo intensywnie w latach 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku [16, 40]. Sądzono wówczas, że do wydajnej produkcji energii elektrycznej przy pomocy MFC niezbędny jest dodatek kosztownych egzogennych mediatorów. Jednakże w 1999 roku K i m i wsp. skonstruowali ogniwo, w którym energia generowana była przez naturalnie istniejące konsorcjum bakterii bez udziału zewnętrznych mediatorów [29]. Uzyskane rezultaty spowodowały ponowne zainteresowanie się naukowców tym tematem, zwłaszcza w obliczu konieczności poszukiwania alternatywnych źródeł energii odnawialnej. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe są obecnie traktowane jako obiecująca technologia umożliwiająca pozyskiwanie energii elektrycznej [41].

2. Zasada działania i rodzaje MFC

W ogniwach mikrobiologicznych to mikroorganizmy przekształcają materię organiczną w elektryczność. Wydaje się, że do produkcji energii może być tu wykorzystane każde biodegradowalne źródło materii organicznej, począwszy od czystych związków (np. octan, glukoza, cysteina, etanol), a skończywszy na mieszaninach związków organicznych, włączając w to ciekłe odpady komunalne i zwierzęce, odcieki ze składowisk

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: +48-554-14-23; fax.: +48-554-14-04; kgrzes@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Schemat mikrobiologicznego ogniwa paliwowego (MFC) zawierającego elektrycznie przewodzącą grafitową anodę w kształcie szczotki (stanowiącą powierzchnię do wzrostu mikroorganizmów) i płaską pasywnie natlenianą katodę.

e^- – elektrony, H^+ – protony

czy ciekłe odpady pochodzenia rolniczego i przemysłowego [37, 73]. Substraty szeroko stosowane w MFC zostały wymienione w pracy przeglądowej przez P a n t a i wsp. [48]. To dzięki zdolności mikroorganizmów do wykorzystywania różnych źródeł materii organicznej MFC wydają się być idealną technologią do produkcji energii z biomasy [34].

Mikrobiologiczne ogniwo paliwowe składa się zazwyczaj z dwóch przedziałów: anodowego oraz katodowego, oddzielonych od siebie półprzepuszczalną membraną wymiany protonów (PEM; *Proton Exchange Membrane*), co zapewnia beztlenowe warunki w przedziale anodowym [78]. Schemat ogniwa przedstawiono na rys. 1. Zasada działania najprostszego MFC opiera się na przekształceniu energii chemicznej zawartej w związkach organicznych bezpośrednio w energię elektryczną. Jest to możliwe dzięki utlenieniu materii organicznej przez znajdujące się w przedziale anodowym komórki mikroorganizmów (pełnią one rolę swoistych biokatalizatorów) i przekazaniu elektronów na znajdującą się w pobliżu elektrodę z jednoczesnym uwolnieniem protonów do roztworu. Proces ten zachodzi w warunkach beztlenowych. Uwolnione elektrony przemieszczają się następnie w kierunku katody poprzez zewnętrzny obwód elektryczny, co w sytuacji występowania różnicy potencjałów między anodą i katodą, powoduje wytworzenie prądu. Równocześnie protony powstałe na anodzie migrują przez półprzepuszczalną membranę do natlenianej katody. Na katodzie ma miejsce chemiczny lub mikrobiologiczny proces redukcji, gdzie protony w połączeniu z elektronami i tlenem tworzą wodę [33, 73].

Ogniwo dwukomorowe było pierwszym, najprostszym modelem MFC, lecz ogniwa mikrobiologiczne mogą funkcjonować także w innych konfiguracjach. Ze względu na konieczność napowietrzania roztworu w przedziale katodowym w celu dostarczenia tlenu do reakcji redukcji, rozpoczęto modyfikacje tego podstawowego modelu. Zmiany miały na celu głównie obniżenie kosztów procesu oraz zwiększenie wydajności pracy MFC. Skonstruowano m.in. ogniwa jednokomorowe, w których zrezygnowano z membrany oddzielającej obie elektrody, a katoda miała stały bezpośredni kontakt z powietrzem [32, 33]. Proponowano także ogniwa o konfiguracji płaskiej [41], cylindrycznej, tubularnej [53] czy zgrupowane w układy pozwalające na wydajną ciągłą pracę tych bioreaktorów [3]. Wprowadzane różnice dotyczyły również sposobu zasilania ogniw paliwem, np. substrat dozowano do przedziału anodowego partiami bądź przepływał przez system w sposób ciągły [40]. Z kolei w układach osadowych otwartych wykorzystano kombinację elektrod do pozyskania energii służącej do zasilania urządzeń telemetrycznych na dnie morza czy oceanu [57]. Poza powyższym, proponuje się obecnie także inne podziały ogniw mikrobiologicznych, np. na trzy główne typy MFC: fotoautotroficzne, heterotroficzne i osadowe [55]. W innym przypadku systematyka uwzględnia m.in. sposób transportu elektronów z komórek mikroorganizmów do anody [66].

3. Mikroorganizmy wytwarzające elektryczność

Produkcja energii w ogniwie jest możliwa dzięki mikroorganizmom, głównie bakteriom, które po utlenieniu substratu do dwutlenku węgla z jednoczesnym uwolnieniem protonów i elektronów, są zdolne do transportu tych ostatnich na zewnątrz komórki. Część gatunków dodatkowo zamiast transportować elektrony na egzogenny akceptor, przekazuje je bezpośrednio na anodę. Takie zjawisko nazwano elektrogenezą, a grupy elektrochemicznie aktywnych mikroorganizmów [13] zdolnych do przeprowadzania tego procesu to egzoelektrogeny [35, 37] elektrogeny [9] czy elektricigeny [39, 60].

Źródłem pozyskania organizmów do MFC są zwykle bogate w mikroorganizmy osady denne, próbki gleby czy ścieków [3, 31, 62]. Ponadto często wykorzystuje się próby uprzednio aktywowanych osadów pochodzących z procesów oczyszczania ścieków przez rośliny czy z innego wcześniej działającego MFC [49, 50, 68, 80]. Zważywszy na stosowany różnorodny rodzaj *inoculum,* w przedziale anodowym odnajduje się przedstawicieli różnych gatunków mikroorganizmów. Poza licznymi niezidentyfikowanymi organizmami, są wśród nich bakterie należące do klas: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Clostridia, Bacteroidetes, Flavobacteria*, *Sphingobacteria, Deferribacteres*, *Spirochaetes*, *Planctomycetes*, *Nitrospirales* ale również grzyby, np. z rodzaju *Saccharomyces*

czy *Pichia* [14, 31, 43, 52]. Niewątpliwie właśnie bakterie są wykorzystywane właściwie we wszystkich bieżących MFC [63].

O zróżnicowaniu społeczności mikroorganizmów w obrębie MFC decyduje nie tylko pochodzenie próbki stanowiącej *inoculum*, ale także rodzaj paliwa stosowanego do zasilania ogniwa, obecność mediatorów redoks czy warunków tlenowych w bioreaktorze [63]. Aby uniknąć konkurowania tlenu z przenośnikami elektronów (mediatorami), anoda w większości MFC powinna być umiejscowiona w warunkach beztlenowych [14]. W systemach generujących energię w obecności ściśle beztlenowych warunków, *Geobacter* sp., stanowią ponad 70% wszystkich mikroorganizmów obecnych na powierzchni anody, dlatego początkowo podejrzewano, że ten rodzaj bakterii odgrywa główną rolę w generowaniu energii. Jednak w innych MFC, gdzie reaktor pozwala na przeciek tlenu do przedziału anodowego, dominują organizmy bardziej tolerancyjne w stosunku do tlenu [40]. W większości przypadków w społecznościach mikroorganizmów przeważają przedstawiciele Gram-ujemnych gatunków bakterii należących do typu *Proteobacteria*, chociaż skład gatunkowy i ilość przedstawicieli należących do poszczególnych klas w obrębie tej grupy filogenetycznej zmienia się w zależności od rodzaju *inoculum* wykorzystanego w ogniwie, czy też materiału z którego została wykonana anoda [31, 69]. Skład konsorcjum na anodzie może ponadto zależeć od rodzaju zastosowanej katody (jej modyfikacji) oraz czasu działania ogniwa [80]. Należy też zaznaczyć, że czynnikiem różnicującym skład bioanody jest nie tylko rodzaj, ale także sposób dostarczania substratu do ogniwa. MFC działające w trybie dozowanym lub przepływowym różnią się nie tylko występującymi mikroorganizmami, ale również preferowanymi mechanizmami transferu elektronów na anodę, np. w systemie dozowanym obserwuje się selekcję w kierunku mikroorganizmów produkujących związki funkcjonujące jako mediatory. To rozwiązanie z kolei wydaje się mieć mniejsze znaczenie dla produkcji energii w systemach przepływowych, gdzie mamy do czynienia z częstą wymianą płynów wokół anody [40]. Zastanawiający jest jednocześnie fakt, że chociaż wiele różnych gatunków mikroorganizmów jest zdolnych do produkcji energii w MFC, gdy funkcjonują w ogniwie jako czyste kultury generują jedynie niskie napięcie [34]. Przeprowadzone ostatnio badania dowiodły, że wzbogacenie bioanody z *Geobacter sulfurreducens* w kulturę bakterii nieaktywnej elektrochemicznie (*Escherichia coli*) usprawniło działanie systemu i zwiększyło ilość generowanej energii w stosunku do czystej kultury elektricigenu *G. sulfurreducens*. Prawdopodobną przyczynę tego zjawiska upatruje się w redukowaniu przez *E. coli* tlenu w przedziale anodowym, przy czym obecność gazu w pobliżu bioanody była spowodowana przeciekiem z przedziału katodowego [47]. Z tego powodu postuluje się istotną rolę konsorcjów, tj. całych społeczności mikroorganizmów, elektrochemicznie aktywnych, na wydajność działania MFC [50].

Badania prowadzone w latach 90-tych ubiegłego stulecia sugerowały, że immobilizacja komórek bakterii na powierzchni elektrody zwiększa wydajność transportu elektronów pomiędzy komórką bakterii a elektrodą. Dzięki temu możliwe było utworzenie stabilnej bioanody zdolnej do wytwarzania mocy nawet przez kilka dni [1]. Obecnie projektuje się MFC, w których bakterie rosną na powierzchni anody w postaci biofilmu [7, 53]. Wykazano, że struktura ta jest kluczowa dla transferu elektronów z powierzchni komórki na anodę, co jak wiadomo jest podstawą funkcjonowania samego ogniwa, ponieważ wzrost bakterii w postaci biofilmu umożliwia bezpośredni kontakt komórek elektricigenów z powierzchnią elektrody [82]. Biofilmy tworzone na anodzie są wielogatunkowymi skupiskami mikroorganizmów o zróżnicowanej strukturze przestrzennej. Dowiedziono, że grubość tych struktur nie jest stała, a w zależności od rodzaju dostarczanego do ogniwa substratu, zaobserwowano nie tylko różnice w strukturze i składzie gatunkowym biofilmów, ale również zmiany kształtu tworzących je komórek bakterii [79, 82]. Jednak mała ilość badań poruszających to zagadnienie nie pozwala na dokładniejsze jego zgłębienie.

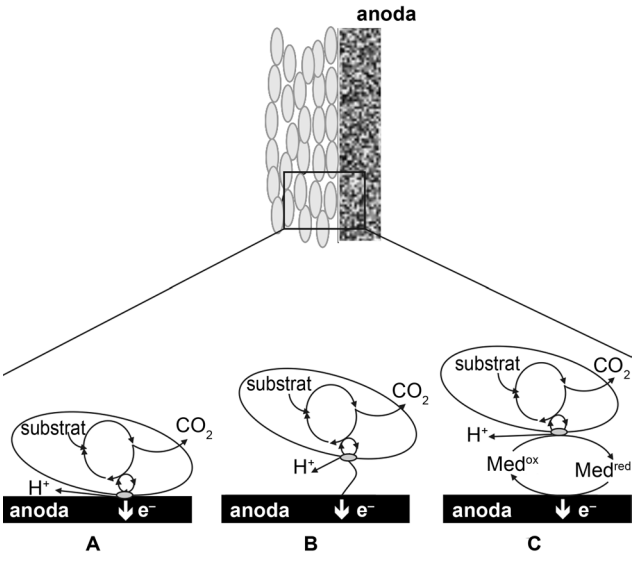
Jak do tej pory najwyższe wartości mocy generują MFC z wielogatunkową bioanodą, gdzie mikroorganizmy rosną w postaci biofilmu [61]. Mieszane kultury albo konsorcja mikroorganizmów wydają się być solidne i bardziej wydajne niż pojedyncze szczepy, a ich izolacja ze źródeł naturalnych jest dużo łatwiejsza. Stosowanie czystych kultur ma z kolei pewne ograniczenia techniczne, głównie ze względu na konieczność zapewnienia warunków sterylnych i wysokie koszty procesu [49]. Próby produkcji energii w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych prowadzi się także z wykorzystaniem monokultur bakterii, np. elektricigenów nie wymagających dodatku egzogennych mediatorów tj. *Geobacter* sp. czy *Shewanella* sp. [8, 59]. Badania tych bakterii redukujących związki żelaza lub manganu (*Deltaproteobacteria*) nie tylko pozwoliły na scharakteryzowanie wspomnianej grupy mikroorganizmów aktywnych elektrochemicznie, ale również dostarczyły ważnych informacji o sposobach elektrotransferu, który bezpośrednio wpływa na wydajność pracy MFC [18, 82]. Jak dotąd dowiedziono, że czyste kultury *Geobacteraceae* są zdolne do pozyskiwania energii niezbędnej do wzrostu przez całkowite utlenianie octanu i innych związków organicznych do CO_2 z jednoczesnym wykorzystaniem elektrody jako akceptora elektronów. W tym przypadku zdolność *Geobacteraceae* do produkcji elektryczności jest prawdopodobnie związana ze zdolnością bakterii do transferu elektronów na tlenki żelaza (III) i manganu (IV), znajdujące się na zewnątrz komórki, które są

nierozpuszczalnymi zewnątrzkomórkowymi akceptorami elektronów [7]. Wyniki badań ekspresji genów *Geobacter sulfurreducens*, wykazały, że wiele spośród białek biorących udział w transferze elektronów na zewnętrzne akceptory (np. cytochromy OmcB, OmcS i OmcE) jest także zaangażowane w elektrotransfer na anodę [18, 21], co wykazało, że elektricigeny wykorzystują elektrochemicznie aktywne enzymy redoks. Odkrycie u *Shewanella* sp. charakterystycznych pili, wykazało jednak, że nie jest to jedyny wykorzystywany sposób transportu elektronów [19, 59]. Co więcej, *Shewanella oneidensis* produkuje dodatkowo flawiny, funkcjonujące jako przenośniki elektronów, a to wskazuje na wykorzystywanie wielu dróg elektrotransferu przez ten gatunek bakterii [10]. Wszystkie poznane jak dotąd sposoby przekazywania elektronów na elektrodę zostaną dokładniej przedstawione w kolejnym rozdziale.

4. Transfer elektronów na anodę

Podstawa procesu generowania prądu przez ogniwo leży w naturze mikroorganizmów, które przekazują elektrony ze zredukowanego donora elektronów, o niskim potencjale elektrochemicznym, na akceptor, o wyższym potencjale, jak np. tlen [76]. Elektrony generowane przez bakterie w procesach katabolicznych, przechowywane są w komórkach bakterii w formie intermediatów, jak np. NADH. Mediatory redoks obecne w roztworze dyfundują do wnętrza komórek mikroorganizmów, gdzie konkurują z tlenem w utlenianiu części spośród tych elektronów a następnie dyfundują do zewnętrznych osłon komórkowych, skąd mogą być przekazane na zewnątrzkomórkowy akceptor elektronów [14]. W przedziale anodowym MFC nie ma jednak tlenu, a obecność elektrody determinuje w pewien sposób metabolizm bakterii [2]. W sytuacji, gdy anoda ma wyższy potencjał niż inne dostępne dla bakterii akceptory elektronów, np. siarczki obecne w dostarczanym źródle materii organicznej, to właśnie ona jest preferowanym akceptorem elektronów. Zysk energetyczny bakterii w przypadku przekazania elektronów na anodę jest wyższy, a taka sytuacja determinuje metabolizm bakterii w kierunku elektrogenezy [56]. Wiadomo jednak, że niektóre mikroorganizmy obecne w przedziale anodowym, w warunkach beztlenowych, prowadzą alternatywny metabolizm, tj. fermentację, metanogenezę lub wykorzystują alternatywne akceptory elektronów, które nie prowadzą do produkcji energii [82].

Transfer elektronów pomiędzy komórką bakterii a elektrodą może odbywać się na cztery sposoby. (i) Bezpośrednio (rys. 2A), co ma miejsce w sytuacji, gdy centra aktywne enzymów błonowych, np. wspomnianych cytochromów, znajdują się w bezpośrednim kontakcie z anodą (DET, *Direct Electron Transfer*). W tym przypadku tempo transferu elektronów może być bardzo niskie ze względu na odizolowanie miejsca aktywnego enzymu od powierzchni elektrody, spowodowane jego lokalizacją wewnątrz cząsteczki białka lub zakotwiczeniem enzymu głęboko w osłonach bakteryjnych [64]. Enzymy redoks niektórych gatunków egzoelektrogenów zaangażowane w transfer elektronów na anodę mogą być jednak zlokalizowane na powierzchni osłon mikroorganizmu, a ich centra aktywne obecne w zewnętrznych partiach cząsteczek białkowych, umożliwiając tym samym bezpośredni ich kontakt z podłożem albo elektrodą [59]. W takich okolicznościach (np. u *G. sulfurreducens*) obserwuje się transfer elektronów na stosunkowo wysokim poziomie [18]. (ii) Transport bezpośredni może odbywać się także z wykorzystaniem pili określanych także jako nanodruty (*nanowires*) (rys. 2B). Są to fibrylarne struktury białkowe o długości 2–3 μm, po raz pierwszy opisane u *S. oneidensis* MR-1, a występujące u nielicznych gatunków bakterii, które prawdopodobnie ułatwiają transfer elektronów przez stabilizowanie kontaktu bakterii z powierzchnią rudy tlenku metalu czy, w przypadku MFC, z elektrodą. Co ważne, są one dobrymi przewodnikami i sugeruje się, że mogą pośredniczyć także w kontakcie między komórkami bakterii [59, 62]. (iii) Pośrednio (rys. 2C) elektrony są transportowane z udziałem mediatorów (MET, *Mediated Electron Transfer*). W tym przypadku obserwuje się znacznie wyższe tempo niż dla bezpośredniego transferu, co umożliwiają dodane wcześniej (egzogenne) lub naturalnie występujące tj. wytwarzane przez bakterie, mediatory redoks. Są to stabilne, występujące w dwóch stanach (zredukowanym lub utlenio-



Rys. 2. Biofilm na powierzchni anody. Schematycznie przedstawiono komórki mikroorganizmów i sposoby transferu elektronów na pobliską elektrodę: bezpośredni z wykorzystaniem enzymów błonowych (A), transport przez przewodzące elektryczność nanodruty (B), pośredni z użyciem mediatorów (C).

Med^{ox} – mediator w stanie utlenionym, Med^{red} – mediator w stanie zredukowanym, e^- – elektrony, H^+ – protony

nym) związki niskocząsteczkowe, które mogą szybko dyfundować przez kanały enzymatyczne, a przez to efektywnie transportować elektrony z miejsca aktywnego enzymu do powierzchni elektrody. Zastosowanie egzogennych mediatorów (np. naturalnej czerwieni czy 1,4-naftochinonu) stwarza problemy, gdyż dodawanie do roztworu rozpuszczalnych substancji w procesie oczyszczania wody (z czym wiąże się potencjalne zastosowanie MFC) jest niezgodne z założonym pierwotnie celem i znacznie podnosi koszty procesu [51]. Dlatego dużo większe znaczenie aplikacyjne ma transfer pośredni poprzez przenośniki wytwarzane przez same elektrochemicznie aktywne bakterie. Wykazano, że obecność cząsteczek przenośników wzmaga transfer w obrębie wielowarstwowych biofilmów na anodzie [62]. (iv) Innym mechanizmem jest bezpośrednie utlenianie na anodzie produktów metabolizmu eksportowanych przez mikroorganizmy [62]. W tym procesie przeprowadzanym na powierzchni anody bakterie mogą wykorzystywać zarówno produkty metabolizmu pierwotnego, jak i wtórnego. Szerzej to zagadnienie opisali H e r n a n d e z i N e w m a n [20]. Zanotowano w tym przypadku możliwość uzyskania wysokiego napięcia w MFC, jednak w procesie powstają także produkty bez znaczenia elektrochemicznego, co wpływa negatywnie na wydajność pracy ogniwa, obniżając jego sprawność kulombowską [64] (to zagadnienie będzie wyjaśnione w rozdziale poświęconym wydajności MFC)

Gdy organizmy rosną na powierzchni anody w formie biofilmu, tylko nieliczne komórki mają możliwość bezpośredniego kontaktu z elektrodą i to właśnie one mogą transportować elektrony w sposób bezpośredni. Z drugiej strony, wiadomo, że w biofilmach monokulturowych (np. *G. sulfurreducens*) wszystkie komórki pozostają metabolicznie aktywne i współuczestniczą w generowaniu napięcia [18]. W wielowarstwowych strukturach biofilmów, które przekraczają niekiedy nawet 50 μm, większość komórek mikroorganizmów może zatem kontaktować się z anodą jedynie za pośrednictwem innych komórek. Z tego wynika, że większość organizmów przekazuje elektrony w kierunku elektrody przez nanodruty, a transport ten może być również usprawniany przez mobilne cząsteczki mediatorów obecne w macierzy zewnątrzkomórkowej w biofilmu [56].

5. Wydajność pracy MFC

Wydajność pracy ogniw mikrobiologicznych jest kluczowym zagadnieniem w kontekście wykorzystania ich jako konkurencyjnej technologii do produkcji odnawialnej energii elektrycznej. Dlatego głównym wyzwaniem badaczy jest utworzenie takiego ogniwa, które generowałoby dużą ilość mocy przy zasilaniu odpadami przemysłowymi. Najczęściej ilość wytwarzanej przez MFC energii elektrycznej podawana jest w postaci mW lub mA w przeliczeniu na metr kwadratowy powierzchni użytej w ogniwie anody [56]. Natomiast wydajność pracy ogniwa charakteryzuje się za pomocą różnych parametrów takich jak: sprawność kolumbowska, określająca liczbę transportowanych elektronów w stosunku do liczby elektronów teoretycznie generowanych przez substrat, czy tempo biokonwersji substratu [3]. Często wykorzystywany jest także parametr biologiczny jakim jest chemiczne zapotrzebowanie na tlen (COD, *Chemical Oxygen Demand*), który zależy zarówno od ilości komórek bakteryjnych, jak i kinetyki procesów przeprowadzanych przez bakterie, czy dostępności biomasy organicznej w dostarczanym paliwie [54].

W latach 90-tych ubiegłego stulecia, wykorzystywane dotychczas systemy były w stanie generować jedynie prąd o bardzo niskiej mocy, tj. poniżej 0,1 mW/m^2 [29]. Niskie wartości były w głównej mierze konsekwencją organizacji ogniwa, elektrod, jak również oporu wewnętrznego ogniwa [1]. Późniejsze, nieustanne udoskonalenia tej technologii pozwoliły na osiągnięcie mocy 1500 mW/m^2 [37] czy nawet 5850 mW/m^2 [62]. Oczywiście należy podkreślić, że te wartości uzyskano w ogniwach zasilanych czystymi jednorodnymi substratami jak glukoza czy octan (mającymi symulować substancje organiczne zawarte w odpadach ciekłych). W przypadku ogniw wykorzystujących jako paliwo mieszaninę związków organicznych, tj. prawdziwe ścieki, gdzie zawartość biomasy organicznej jest z reguły dużo mniejsza, uzyskuje się niestety dużo niższe wartości (od 0,26 do 0,45 W/m^2) [15, 76]. Sprawność kolumbowska ogniw projektowanych na potrzeby laboratoryjne wykorzystujących czysty substrat wynosi nawet 80–99%, jednak parametr ten dla ogniw przetwarzających np. ścieki browarnicze jest już na czterokrotnie niższym poziomie [76]. Wiadomo, że aby uzyskać maksymalną teoretyczną ilość energii w ogniwie, dostarczany substrat musi ulec całkowitemu utlenieniu do CO_2 przy jednoczesnym efektywnym transporcie elektronów na elektrodę. Zważywszy na ten pierwszy warunek i niejednorodny skład odpadów dostarczanych do MFC, uzyskanie wysokiej sprawności ogniwa wydaje się bardzo trudne. Z kolei typowe wartości COD uzyskiwane w MFC oscylują między 40 a 60% usuniętego COD, przy czym w MFC zasilanych glukozą uzyskano nawet 90% [61, 72]. Pomimo licznych starań w dalszym ciągu nie udało się otrzymać napięcia elektrycznego w wysokości odpowiadającej teoretycznej maksymalnej wydajności pracy pojedynczego ogniwa (tj. 1,14V). Jak dotąd pojedyncze ogniwo jest w stanie generować jedynie od 0,3 do 0,7 V [80, 81]. Dlatego też wciąż toczy się debata nad wydajnością technologii MFC i prowadzi się ciągłe próby jej usprawniania. Niewątpliwym celem jest bowiem stworzenie takiego ogniwa, które wytwarza jak najwyższą ilość energii przy jak najniższym wkładzie energetycznym [26].

Istnieje wiele parametrów zarówno biologicznych, fizycznych, jak i chemicznych, które mają wpływ na wydajność pracy MFC. Parametry dotyczą m.in. szybkości transferu masy w obrębie biofilmu, procesu utleniania substratu, który przeprowadzany jest przez mikroorganizmy, transferu elektronów oraz reakcji redukcji zachodzącej na katodzie. Jednakże to zagadnienie transferu elektronów i aktywności biologicznej mikroorganizmów jest najczęściej poruszanym spośród wszystkich tych problemów [51].

O ilości generowanej przez ogniwo mocy decyduje przede wszystkim rodzaj i gęstość komórek współtworzących konsorcjum bioanody [75]. Na jego aktywność z kolei, w przypadku elektricigenów, mogą wpływać zmiany ilości związanych z błoną transporterów elektronów w pojedynczych komórkach [18]. Natomiast tempo procesu biokonwersji przeprowadzanego przez mikroorganizmy zależy od temperatury i pH panujących w ogniwie. Wśród zalet MFC upatruje się wprawdzie możliwość funkcjonowania w temperaturach niskich (tj. 20–30°C) w porównaniu z alternatywnymi metodami biokonwersji (np. oddychaniem beztlenowym), jednakże te właśnie niskie temperatury traktowane są niekiedy jako czynnik limitujący [76]. Ważnym parametrem jest również pH roztworu, co ma szczególne znaczenie w przypadku bezpośredniego kontaktu bioanody z dostarczanym substratem. Gdy paliwem są ścieki, bardzo trudno jest zapewnić stałe pH optymalne dla rozwoju mikroorganizmów. Z drugiej strony utlenianie substancji organicznych zawartych w dostarczanym substracie, jak już wspomniano, generuje protony, które teoretycznie są transportowane do przedziału katodowego. Zauważono jednak, że transport ten może być utrudniony, co prowadzi do zakwaszenia roztworu wypełniającego przedział anodowy [51], a to z kolei obniża aktywność biologiczną mikroorganizmów i objawia się zmniejszeniem ilości generowanej w ogniwie energii. Obecność protonów przede wszystkim negatywnie wpływa na proces elektrochemicznego utleniania rozpuszczonego w roztworze mediatora redoks, po wtóre grubość biofilmu tworzonego przez neutrofile pod wpływem szybkiego obniżenia pH może ulec zmniejszeniu [51].

Nie można pominąć także znaczenia jakości substratu na uzyskiwaną wydajność MFC. Teoretycznie im bardziej zredukowany związek jest wykorzystywany tej roli, tym większą moc można uzyskać, wiadomo bowiem, iż dużo mniejszą ilość energii elektrycznej generują ogniwa zasilane odpadami ciekłymi w porównaniu z tymi, do których dostarczane są czyste substraty. Zaobserwowano jednocześnie wzrost wydajności procesu po wzbogaceniu ścieków w octan. Okazuje się bowiem, że ilość generowanej przez MFC mocy rośnie wraz ze wzrostem w ściekach frakcji szybko biodegradowalnej. Na sprawność kolumbowską ma wpływ również obecność chemikaliów jakie znajdują się w odpadach ciekłych [41], stąd ponownie obserwuje się obniżenie wydajności pracy ogniwa zasilanego przez ścieki przemysłowe zawierające duże ilości tego typu związków w porównaniu z czystym substratem. O efektywności ogniwa decyduje także sposób jego zasilania. Pomijając fakt konieczności przestojów w pracy MFC, w przypadku tych zasilanych przez dozowanie, możliwy jest wzrost organizmów wytwarzających rozpuszczalne mediatory redoks. Z drugiej strony ogniwa pracujące ciągle, stale zasilane substratem, sprzyjają rozwijaniu się gatunków rosnących w postaci biofilmu, które mogą transportować elektrony bezpośrednio na elektrodę [56]. Duże znaczenie dla wysokiej wydajności procesu mają także czynniki związane z budową ogniwa, takie jak stosunek powierzchni obu elektrod i odległość między nimi oraz materiał, z którego je wykonano, czy też wielkość samego reaktora i tryb jego pracy [38, 44, 72]. Membrana jonoselektywna, jako jedna z najważniejszych części składowych ogniwa, decyduje o sprawnym transporcie protonów w kierunku katody, a zbyt mała jej powierzchnia może być czynnikiem ograniczającym szybkość zachodzących w ogniwie reakcji [11, 45]. Wśród naukowców trwa nawet dyskusja dotycząca konieczności jej stosowania, są bowiem zwolennicy konstruowania dużo tańszych ogniw pozbawionych PEM [70, 72].

Ilość generowanej w MFC mocy w dużym stopniu zależy również od stężenia tlenu w przedziale katodowym, a reakcja redukcji zachodząca na katodzie może być czynnikiem limitującym jego działanie. Słaby kontakt między źródłem dostępu tlenu i elektrodą ograniczają tempo procesu [26]. Z drugiej strony, przedostawanie się tlenu do przedziału anodowego, może powodować redukcję ilości generowanej elektryczności z uwagi na beztlenowy metabolizm mikroorganizmów elektrochemicznie aktywnych. Dla zapewnienia stałego wysokiego tempa reakcji na elektrodzie, ewentualny przeciek należy więc ograniczać. Istotnym parametrem jest też kinetyka reakcji redukcji, której przebieg można regulować przez dodatek katalizatorów [76]. W wykorzystywaniu MFC na skalę przemysłową przeszkadza obecny w ogniwie opór wewnętrzny. Konieczne wydają się być modyfikacje ich budowy, które pozwoliłyby na zniwelowanie tego problemu. Zwiększanie rozmiarów ogniwa powoduje, że jego opór wewnętrzny pozostaje co najmniej na takim samym poziomie, przy czym napięcie przepływające przez system zwiększa je i generuje potencjalne straty energii. Ta sytuacja stanowi wciąż znaczące ograniczenie dla zwiększania rozmiarów MFC [41].

6. Optymalizacja pracy ogniwa

Próby optymalizacji procesu prowadzi się na różne sposoby, np. poszukuje się lepszych i tańszych materiałów tworzących membrany jonoselektywne, optyma-

lizuje się transfer masy w ogniwie, czy projektuje się nowe katody. Nowe rozwiązania prowadzą nie tylko do zmniejszenia kosztów produkcji MFC ale też uproszczenia konstrukcji i zwiększenia wydajności ich pracy. Problematyczne próby powiększania rozmiarów ogniw, doprowadziły konstruktorów do stworzenia złożonych układów MFC, dających szanse na zastosowanie ogniw mikrobiologicznych na dużą skalę.

Już wielokrotnie próbowano uzyskać większą ilość energii poprzez modyfikacje elektrod. Zmieniano m.in. rozmiary i kształt anody, a najlepsze efekty uzyskiwano stosując tę elektrodę w kształcie szczotki, zapewniającą zwiększenie porowatości i powierzchni dostępnej dla organizmów elektrochemicznie aktywnych [75]. Jak już wspomniano, zwiększanie powierzchni anody umożliwiającej wzrost bakterii w postaci biofilmu prowadzi do wzmożonej produkcji energii przez MFC [82]. Ostatnie badania wskazują, że można w ten sposób uzyskać poprawę wydajności pracy ogniwa nawet o 150% [68]. Prowadzi się także próby zastosowania różnorodnych materiałów do budowy ogniw, nie tylko tańszych, ale również biokompatybilnych i stabilnych chemicznie. Nie wszystkie z nich charakteryzują się tak dobrym przewodnictwem elektrycznym jak metale, jednak wykorzystanie np. grafitu w połączeniu z nanocząstkami złota pozwoliło na uzyskanie nawet 20-krotnego zwiększenia napięcia w ogniwie w porównaniu z elektrodą jednorodną [75]. Oczekiwane efekty przynosi również dodatek mediatorów redoks na elektrodzie lub w pożywce. Ten sposób ma niestety ograniczenia w zastosowaniu, wspomniane substancje muszą być bowiem regularnie dodawane do bioreaktora czy też poddawane recyklingowi. Rozwiązaniem mogłaby być immobilizacja tych przenośników elektronów na powierzchni elektrody, taki sposób powoduje jednak zmniejszenie ilości generowanej w MFC energii. Ponadto mediatory mogłyby ulegać degradacji w przypadku ciągłej długoterminowej pracy ogniwa [75]. Egzogenne mediatory redoks są bardzo kosztowne, dlatego poza badaniem ogniw o małych rozmiarach, w laboratorium, szersze studia w tym kierunku nie wydają się być przyszłościowe.

Zanurzenie katody w wodzie bogatej w rozpuszczony tlen można zastąpić stałym jej wystawieniem na działanie powietrza, czyli pasywnym natlenianiem tej elektrody (*air-cathode*) lub zastosowaniem katody połączonej z membraną półprzepuszczalną. Dodatkowo, aby usprawnić jej funkcjonowanie stosuje się wspomniane już katalizatory reakcji. Przykładem może być platyna, która zwiększa kontakt tlenu z katodą, efektywnie redukuje nadpotencjał pojawiający się na elektrodzie i w efekcie przyczynia się do zwiększenia napięcia generowanego przez MFC [38]. Jednak stosowanie platyny znacznie podwyższa koszty projektu, a ponadto metal ten okazał się być wrażliwy na siarczki dyfundujące z przedziału anodowego przez PEM [72]. Dlatego poszukuje się tańszych katalizatorów, innych niż platyna, takich jak: cyjanek żelaza [44], nadmanganian potasu [84], dichromian potasu czy tlenek manganu [80] celem obniżenia kosztów procesu. Z kolei zastosowanie heksacyjanożelazianu, w roli akceptora elektronów, umożliwiło dodatkowe ulepszenie funkcjonowania MFC, jednak związek ten, ze względu na swą toksyczność, nie jest dobrym pretendentem do zastosowania na dużą skalę. Alternatywą wydaje się być zatem wykorzystanie tlenków metali zintegrowanych z węglem lub specjalnych materiałów, jak fullereny, jako materiał do konstrukcji katody polepszający kontakt elektrody z tlenem [55]. T s a i i wsp. zastosowali z kolei węglowe katody w MFC zasilanych ściekami. W tym przypadku, dodatek nanorurek węglowych przy jednoczesnej rezygnacji z platyny, zwiększył generowane przez ogniwo napięcie i moc oraz jego sprawność kolumbowską, a zrezygnowanie z katalizatora umożliwiło zmniejszenie kosztów projektu [72]. Innym obiecującym rozwiązaniem jest wykorzystanie biokatody, która ma pewną przewagę nad konwencjonalnymi katodami abiotycznymi. Poza niższymi kosztami konstrukcyjnymi i operacyjnymi, osiągane są dodatkowe korzyści związane z wytwarzaniem przez rosnące na jej powierzchni mikroorganizmy użytecznych produktów oraz usuwaniem zbędnych związków z przedziału katodowego [80].

W ogniwach jednokomorowych problemem jest dyfuzja tlenu z przedziału katodowego w otoczenie anody, co może zmniejszyć aktywność egzoelektrogenów, a tym samym ilość generowanej energii. W takich przypadkach proponowano napowietrzanie ogniwa azotem, dodanie L-cysteiny lub zawieszonych komórek, które ograniczały efekt dyfuzji przez wyłapywanie cząsteczek tlenu [42].

Wciąż największym problemem związanym z MFC jest przejście z eksperymentów prowadzonych na skalę laboratoryjną do tzw. dużej skali pozwalającej na zastosowanie tych ogniw w przemyśle. Ogniwa o dużych rozmiarach reaktora nie generują bowiem proporcjonalnie większej ilości mocy w stosunku do małych MFC. Zauważono jednak, że rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie większej ilości pojedynczych ogniw połączonych szeregowo czy równolegle zamiast powiększenia rozmiarów jednego bioreaktora, ponieważ takie złożone systemy cechuje większa wydajność w porównaniu z dużymi, pojedynczymi MFC [3, 22, 81]. Niestety jednocześnie zaobserwowano, że połączeniu ogniw towarzyszy zmniejszenie napięcia w obwodzie elektrycznym [46]. Aby zniwelować straty energii, próbuje się zwiększać odległości między elektrodami lub zmniejszać przestrzeń wzajemnego przepływu substratu [81].

Wspomniano już o zwiększeniu skali ogniw mikrobiologicznych, ale nie sposób pominąć badań mających na celu zmniejszenie ich rozmiarów. Próbuje się bowiem

miniaturyzować MFC tworząc bardzo małe ogniwa o pojemności kilku mililitrów czy wręcz kilku mikrolitrów, tzw. mikro-MFC (μMFCs), które mogłyby posłużyć do zasilania elektroniki, miniaturowych urządzeń medycznych lub służyć jako źródło impulsu elektrycznego do elektroporacji komórek ssaczych [74]. Miniaturowe MFC powinny przy tym zminimalizować pobór tlenu i energii potrzebnej do ich obsługi. Jednak w kontekście uzyskiwanej małej ilości energii, zbudowanie przedziałów anodowego i katodowego odpowiednich dla kombinacji mikroorganizmów i mediatorów stosowanych w mikro skali wciąż pozostaje wyzwaniem [14].

7. Wykorzystanie ogniw mikrobiologicznych

Już niemal dwadzieścia lat temu A l l e n i B e n e t t o proponowali zastosowanie ogniw mikrobiologicznych, np. do zasilania małych pojazdów czy łodzi bez konieczności ładowania baterii, jako małych generatorów mocy do wykorzystania w miejscach bez dostępu do elektryczności, czy też jako wyposażenie małych oczyszczalni odpadów w cukrowniach czy mleczarniach pozwalające na jednoczesne generowanie energii elektrycznej [1]. Obecnie proponowane zastosowania mikrobiologicznych ogniw paliwowych są dużo szersze: poza utylizacją ścieków przemysłowych, MFC mogłoby posłużyć do odsalania wody morskiej, produkcji wodoru, bioremediacji gleb, zasilania przenośnych urządzeń elektrycznych i stacji telemetrycznych, czy funkcjonować jako biosensory. Takie zastosowania, jak np. zasilanie bio-robotów, są o wiele bardziej interesujące, niż pierwotnie proponowany cel ogniw mikrobiologicznych. Co więcej, w niektórych przypadkach nie są to już tylko teorie, obecnie prowadzi się bowiem wiele badań pilotażowych w tym zakresie, a niektóre z nich znalazły już swoje zastosowanie w praktyce.

Podstawową aplikacją MFC, zgodnie z ich ideą, powinno być wytwarzanie energii elektrycznej z jednoczesną utylizacją odpadów płynnych. Niestety w związku ze wspomnianymi już problemami technologicznymi ogniwa te nie są obecnie wydajnym źródłem energii. Pomimo, iż ilość wytwarzanej energii nie jest zadowalająca, udało się wykorzystać ogniwa mikrobiologiczne do oczyszczania odpadów przemysłowych, chociaż, jak dotąd, opisano niewiele prób utylizacji ścieków w większej objętości. Na przykład w Australii (Yatala, Queensland) przeprowadzono badania pilotażowe, gdzie z pomocą tubularnego reaktora, składającego się z 12 połączonych ze sobą ogniw (każde o objętości 1 litra), z powodzeniem oczyszczano ścieki z pobliskiego browaru [36]. Niestety ilość generowanej przy tym energii nie była znacząca.

Od 2008 roku wykorzystuje się wspomniane już osadowe ogniwa mikrobiologiczne (określane są jako BUGs, *Benthic Unattended Generators)*. Po raz pierwszy rozwiązanie to, umożliwiające pozyskiwanie energii z materii organicznej zgromadzonej w osadach wodnych, zostało zaproponowane przez R e i m e r s a i wsp. w 2001 r. [58]. Obecnie BUGs wykorzystywane są do zasilania zlokalizowanych na dnie zbiorników wodnych stacji telemetrycznych [17]. Urządzenia elektroniczne wchodzące w ich skład, pomimo, iż zlokalizowane są w trudno dostępnych miejscach, dzięki zasilaniu przez ogniwa osadowe, umożliwiają monitorowanie stanu wód lokalnych. Dokonują pomiarów temperatury powietrza lub wody, ciśnienia czy stopnia wilgotności i przekazują te dane w czasie rzeczywistym do odbiorników. W ogniwach typu BUG anoda jest umieszczona w osadzie na dnie zbiornika wodnego, co zapewnia odpowiednią ilość materii organicznej, a brak tlenków pozwala na mikrobiologiczny transfer elektronów na anodę zbudowaną z niekorodującego materiału (np. grafitu czy granulowango węgla) [5]. Anoda jest połączona przez obieg elektryczny z katodą pływającą na powierzchni wody w środowisku tlenowym. Podłączenie takiego osadowego MFC do urządzenia elektrycznego pozwala na jego zasilanie prądem o mocy ok. 100 mW. Chociaż jest to stosunkowo niska wartość, to MFC zupełnie nie wymaga konserwacji i pozwala na co najmniej 2 lata ciągłej pracy bez wyczerpania źródła zasilania [71], co znacznie ułatwia obsługę techniczną oraz koszty utrzymania tych urządzeń. Osadowe ogniwa mikrobiologiczne mogłyby być wykorzystane również do redukcji ilości metanu znajdującego się w powietrzu. Wiadomo bowiem, że obecność bakterii elektrochemicznie aktywnych w osadach hamuje aktywność metaboliczną obecnych tam metanogenów. To ciekawe spostrzeżenie mogłoby posłużyć do kontroli emisji metanu z mokradeł, co ma duże znaczenie, zważywszy na wpływ tego gazu na efekt cieplarniany [25]. Wykorzystanie ogniw na mokradłach mogłoby jednocześnie wspomagać utylizację zgromadzonych tam odpadów [83].

Zasilanie przenośnych urządzeń elektrycznych, szczególnie tych niewymagających dużych ilości energii było już od lat dziewięćdziesiątych potencjalną aplikacją ogniw mikrobiologicznych mającą dużą szansę powodzenia. Zaskakujące natomiast okazało się wykorzystanie MFC do stworzenia Gastrobotów – inteligentnych maszyn pozyskujących energię z rozkładu materii organicznej [77]. Ogniwa mikrobiologiczne zastąpiły w tym przypadku baterie, dając jednocześnie nadzieje na stworzenie wzbudzających kontrowersje samowystarczalnych robotów. Otrzymując lub też same pozyskując biomasę, maszyny te dzięki obecności MFC, są w stanie przetworzyć zawartą w niej materię organiczną na energię umożliwiającą poruszanie lub wykonywanie określonej pracy. Swoistym „pokarmem" mogą być tu niewyrafinowane źródła materii, jak owady (np. muchy), skorupiaki, owoce czy odpady organiczne [23]. Co więcej, roboty

same są w stanie zdobyć pożywienie, np. wabiąc muchy do pułapek feromonowych. Ogniwa mikrobiologiczne zastosowane w maszynach są układami połączonych ze sobą pojedynczych bioreaktorów. Najnowsze projekty („EcoBot III") dodatkowo mają możliwość usuwania zbędnych nieczystości, dlatego też całe instalacje porównuje się do ludzkiego układu pokarmowego [24]. Bardzo ciekawe są przykłady zastosowania takich robotów w praktyce. Potencjalnie proponuje się wykorzystanie ich w eksplorowaniu podwodnych przestrzeni, gdzie maszyny żywiąc się planktonem dostarczałyby informacji o ekologii oceanów, w niebezpiecznych dla ludzi misjach, czy monitorowaniu miejskich systemów kanalizacyjnych [23].

Niezwykłym zastosowaniem technologii ogniw biologicznych jest zasilanie implantowanych urządzeń medycznych z wykorzystaniem glukozy i tlenu zawartych we krwi. Wspomniane wcześniej mikro-MFC mogłyby zapewnić moc do zasilania urządzenia na czas nieokreślony bez konieczności chirurgicznych zabiegów wymiany baterii [17]. Jak dotąd zademonstrowano funkcjonowanie abiotycznego ogniwa wykorzystującego jako substrat glukozę z krwi w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [27]. Wiadomo też, że ogniwa biologiczne, wykorzystujące oczyszczone enzymy zamiast mikroorganizmów, są w stanie pracować w warunkach fizjologicznych [30], wciąż jednak projekty te wymagają usprawnień, aby były one opłacalne. Niestety zastosowanie MFC w medycynie jest ograniczone ze względu na infekcyjny i immunogenny charakter mikroorganizmów, dlatego do badań na tym polu wykorzystuje się zwykle ogniwa enzymatyczne [27].

Zdolność mikroorganizmów funkcjonujących w MFC do degradowania szerokiego spektrum zanieczyszczeń środowiskowych może być jeszcze bardziej cenna niż produkcja energii, szczególnie w układach pozwalających na wykorzystanie technologii do oczyszczania środowiska *in situ* [17]. Wiadomo, że gatunki z rodzaju *Geobacter* są zdolne do degradowania składników ropy naftowej i odcieków ze składowisk obecnych w wodach gruntowych. Utlenianie tych zanieczyszczeń jest powiązane z redukcją żelaza (III). Zarówno procesy utleniania jak i redukcji można z kolei usprawnić przez dodanie mediatorów lub chelatorów Fe (III), a więc ich dodatek do środowiska reakcji mógłby umożliwić utylizację wspomnianych nieczystości. Dowiedziono, że czyste kultury *Geobacter metallireducens* utleniają benzoesan i toluen, wykorzystując elektrodę jako końcowy akceptor elektronów [6], zatem umieszczenie elektrody w glebie zawierającej węglowodory umożliwia zwiększenie tempa degradacji toluenu, benzenu i naftalenu obecnych w środowisku.

MFC wykorzystujące z kolei obecność gatunków *Shewanella* sp. w obrębie bioanody mogą stanowić obiecujące zastosowanie w roli sensorów do identyfikacji biologicznego zapotrzebowania na tlen w ściekach [28]. Zaproponowano także użycie MFC jako urządzenia monitorującego skażenie ścieków. Jego działanie opiera się wówczas na zahamowaniu aktywności biologicznej ogniwa, gdy w dostarczanych odpadach ciekłych znajdują się substancje toksyczne, co skutkuje spadkiem ilości energii generowanej przez MFC. Dzięki zależności między stopniem zahamowania produkcji energii a stopniem skażenia substratu postanowiono nawet zastosować je jako wstępne urządzenie ostrzegające przed toksycznym skażeniem ścieków [65, 67].

Modyfikacje ogniw mikrobiologicznych pozwoliły na ich zastosowanie do odsalania wody morskiej. Co więcej, ostatnie modyfikacje tych układów umożliwiły jednoczesne pozyskiwanie energii ze słonych wód [15]. Proces odwróconej elektrodializy służy do bezpośredniej produkcji energii z gradientu zasolenia tworzonego przez wody morską i słodką. W ogniwie do elektrodializy wykorzystuje się wiele par membran do wymiany anionów lub kationów usytuowanych pomiędzy dwiema elektrodami, która jest niezbędna dla efektywnego wykorzystania gradientu zasolenia do produkcji energii, co znacząco zwiększa koszty konstrukcyjne takich ogniw [15].

Innym przykładem zmodyfikowanych MFC są mikrobiologiczne ogniwa elektrolityczne (MEC; *Microbial Electrolysis Cells*), wykorzystywane do produkcji wodoru. Tutaj, podobnie jak w ogniwach paliwowych, wykorzystywana jest obecność egzoelektrogenów, a ich działanie różni się jedynie koniecznością utrzymywania katody w warunkach beztlenowych. W przedziale katodowym zachodzi proces redukcji protonów do wodoru. Donorem elektronów w MEC jest octan, a w wyniku jego beztlenowej degradacji na bioanodzie powstają CO_2, protony i elektrony [12].

8. Podsumowanie

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC), produkujące energię elektryczną w procesie oczyszczania ścieków stały się jedną z bardziej obiecujących technologii z pogranicza ochrony środowiska, która umożliwia pozyskiwanie prądu elektrycznego. Wykorzystanie biomasy zgromadzonej w odpadach organicznych jest bowiem przyjazne dla natury i zarazem stanowi odnawialne źródło energii. Stosowane dotychczas konwencjonalne metody oczyszczania ścieków wymagają wysokich nakładów finansowych i są związane z koniecznością dostarczania energii elektrycznej do przeprowadzania procesu. W przypadku MFC wprowadzono szereg rozwiązań technologicznych, które znacznie obniżają koszty konstrukcyjne i operacyjne, w tym zastosowanie tańszych materiałów, zaprzestanie dodawania mediatorów redoks czy konstruowanie ogniw z pasywnie natlenianą

elektrodą. Dlatego MFC, jako technologia niskokosztowa i wymagająca dostarczenia z zewnątrz mniejszej ilości energii, jest ciekawą alternatywą [72]. Możliwość wykorzystania w ogniwach mikrobiologicznych substratów o niskiej zawartości materii organicznej, w niskich temperaturach, wyróżnia je na tle innych aktualnie stosowanych procesów pozyskiwania bioenergii i daje przewagę nad procesem oddychania beztlenowego [4]. W związku z faktem, iż ilość energii uzyskiwanej z pracy MFC jest nadal mała, upatruje się w nich sposób na uzupełnienie nisz związanych z niemożnością zastosowania innych metod biokonwersji. Ogniwa mikrobiologiczne mogłyby być zatem niejako uzupełnieniem stosowanych procesów technologicznych. Kolejną zaletą MFC jest fakt, że w wyniku pracy ogniwa emitowany jest głównie dwutlenek węgla oraz gazy, które nie mają znaczenia w pozyskaniu energii elektrycznej. Dzięki temu nie ma potrzeby przeprowadzania dodatkowych procesów obróbki gazów w celu ich utylizacji lub wykorzystania ich potencjału energetycznego [50].

Pomimo potencjalnych korzyści w utylizacji ścieków, technologia MFC jest jeszcze w powijakach i wymaga wielu usprawnień zanim będzie możliwe szerokie jej wykorzystanie. Jednak tempo i zakres badań oraz ilość obserwowanych prób prawdopodobnie doprowadzi wkrótce do skonstruowania wydajnie pracującego ogniwa co daje nadzieje na przyszłość, a przedstawione w pracy różnorodne alternatywne zastosowania MFC potwierdzają użyteczność tej technologii.

Piśmiennictwo

1. Allen R.M., Bennetto H.: Microbial fuel cells: Electricity production from carbohydrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39–40**, 27–40 (1993)
2. Aelterman P., Freguia S., Keller J., Verstraete W., Rabaey K.: The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 409–418 (2008)
3. Aelterman P., Rabaey K., Pham H.T., Boon N., Verstraete W.: Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 3388–3394 (2006)
4. Ahn Y., Logan B.E.: Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour. Technol.* **101**, 469–475 (2010)
5. Arends J.B.A., Blondeel E., Tennison S.R., Boon N., Verstraete W.: Suitability of granular carbon as an anode material for sediment microbial fuel cells. *J. Soils. Sediments*, **12**, 1197–1206 (2012)
6. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R.: Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, **295**, 483–485 (2002)
7. Bond D.R., Lovley D.R.: Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1548–1555 (2003)
8. Bond D.R., Lovley D.R.: Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2186–2189 (2005)
9. Catal T., Bermek H., Liu H.: Removal of selenite from wastewater using microbial fuel cells. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1211–1216 (2009)
10. von Canstein H., Ogawa J., Shimuzu S., Lloyd J.R.: Secretion of flavins by Shewanella species and their role in extracellular electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 615–623 (2008)
11. Chae K.J., Choi M., Ajayi F.F., Park W., Chang I.S., Kim I.S.: Mass transport through a proton exchange membrane (Nafion) in microbial fuel cells. *Energy Fuels*, **22**, 169–176 (2008)
12. Cheng S. Logan B.E.: Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **20**, 18871–18873 (2007)
13. Chang I.S., Moon H., Bretschger O., Jang J.K., Park H.I., Nealson K.H., Kim B.H.: Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 163–177 (2007)
14. Chiao M., Lam K.B., Lin L.: Micromachined microbial and photosynthetic fuel cells. *J. Micromech. Microeng.* **16,** 2547–2553 (2006)
15. Cusick R.D., Kim Y., Logan B.E.: Energy capture from thermolytic solutions in microbial reverse-electrodialysis cells. *Science*, **335**, 1474–1477 (2012)
16. Davis J.B., Yarbrough Jr. H.F.: Preliminary experiments on a microbial fuel cell. *Science*, **137**, 615–616 (1962)
17. Franks A.E., Nevin K.P: Microbial fuel cells, a current review. *Energies* **3**, 899–919 (2010)
18. Fricke K. Harnish F., Schröder U.: On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* **1**, 144–147 (2008)
19. Gorby Y.A., Fredrickson J.K. i wsp.: Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11358–11362 (2006)
20. Hernandez M.E., Newman D.K.: Extracellular electron transfer. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1562–1571 (2001)
21. Holmes D.E., Chaudhuri S.K., Nevin K.P., Mehta T., Methe B.A., Ward J.E., Woodward T.L., Webster J., Lovley D.R.: Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* **8**, 1805–1815 (2006)
22. Ieropoulos I., Greenman J., Melhuish C.: Microbial fuel cells based on carbon veil electrodes: Stack configuration and scalability. *Int. J. Energy Res.* **32**, 1228–1240 (2008)
23. Ieropoulos I., Melhuish C., Greenman J., Horsfield I.: Eco-Bot-II: an artificial agent with a natural metabolism. *J. Adv. Robotic Syst.* **2**, 295–300 (2005)
24. Ieropoulos I., Greenman J., Melhuish C., Horsfield I.: Eco-Bot-III: a robot with guts. Proc. Alife XII Conf., Odense, Denmark, 733–740 (2010)
25. Jeon H.J., Choi Y.K., Kumaran R.S., Kim S., Song K.G., Hong S.W., Kim M., Kim H.J.: Electrochemical control of methane emission from lake sediment using microbial fuel cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* **33**, 2401–2404 (2012)
26. Juang D.F., Lee C.H., Hsueh S.C., Chou H.Y.: Power generation capabilities of microbial fuel cells with different oxygen supplies in the cathodic chamber. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**, 714–731 (2012)
27. Kerzenmacher S., Ducrée J., Zengerle R., von Stetten F.: Energy harvesting by implantable abiotically catalyzed glucose fuel cells. *J. Power Sources* **182**, 1–17 (2008)
28. Kim B.H., Chang I.S., Gil G.C., Park H.S., Kim H.J.: Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* **25**, 541–545 (2003)
29. Kim H.J., Hyun M.S., Chang I.S., Kim B.H.: A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 365–367 (1999)

30. Kim H.H., Mano N., Zhang Y., Heller A.: A miniature membrane-less biofuel cell operating under physiological conditions at 0,5 V. J. *Electrochem. Soc.* **150**, A209–A213 (2003)
31. Lee J., Phung N.T., Chang I.S., Kim B.H., Sung H.C.: Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 185–191 (2003)
32. Liu H., Logan B.E.: Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4040–4046 (2004)
33. Liu H., Ramnarayanan R., Logan B.E.: Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 2281–2285 (2004)
34. Logan B.E.: Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 375–381 (2009)
35. Logan B.E.: Microbial Fuel Cells, Wiley, New York, 2008
36. Logan B.E.: Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1665–1671 (2010)
37. Logan B.E., Regan J.M.: Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* **14**, 512–518 (2006)
38. Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R., Schröder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W., Rabaey K.: Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 5181–5192 (2006)
39. Lovley D.R.: Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 497–508 (2006)
40. Lovley D.R.: Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 327–332 (2006)
41. Min B., Logan B.E: Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5809–5814 (2004)
42. Min B., Cheng S., Logan B.E.: Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research*, **39**, 1675–1686 (2005)
43. Mitra P., Hill G.A.: Continuous microbial fuel cell using a photoautotrophic cathode and a fermentative anode. *Can. J. Chem. Eng.* **90**, 1006–1010 (2012)
44. Oh S.E., Min B., Logan B.E.: Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4900–4904 (2004)
45. Oh S.E., Logan B.E: Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 162–169 (2006)
46. Oh S.E., Logan B.E.: Voltage reversal during microbial fuel cell stack operation. *J. Power Sources*, **167**, 11–17 (2007)
47. Qu Y., Feng Y., Wng X., Logan B.E.: Use of a coculture to enable current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3484–3487 (2012)
48. Pant D., Van Bogaert G., Diels L., Vanbroekhoven K.: A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* **101**, 1533–1543 (2010)
49. Patil S.A., Surakasi V.P., Koul S., Ijmulwar S., Vivek A., Shouche Y.S., Kapadnis B.P.: Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of develo ped microbial community in the anode chamber. *Bioresour. Technol.* **100**, 5132–5139 (2009)
50. Pham T.H., Rabaey K., Aelterman P., Clauwaert P., De Schamphelaire L., Boon N., Verstraete W.: Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Eng. Life Sci.* **6**, 285–292 (2006)
51. Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M., Curtis T.P., Scott K.: Model based evaluation of the effect of pH and electrode geometry on microbial fuel cell performance. *Bioelectrochemistry*, **78**, 8–24 (2010)
52. Prasad D., Arun S., Murugesan M., Padmanaban S., Satyanarayanan R.S., Berchmans S., Yegnaraman V.: Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2604–2610 (2007)
53. Rabaey K., Clauwaert P., Aelterman P., Verstraete W.: Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8077–8082 (2005)
54. Rabaey K., Lissens G., Siciliano D.S., Verstraete W.:, A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1531–1535 (2003)
55. Rabaey K., Ossieur W., Verhaege M., Verstraete W.: Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity. *Water Sci. Technol.* **52**, 515–523 (2005)
56. Rabaey K., Verstraete W.: Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* **23**, 291–298 (2005)
57. Reimers C.E., Girguis P., Stecher H.A., Tender L.M., Ryckelynck N., Whaling P.: Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology*, **4**, 123–136 (2006)
58. Reimers C.E., Tender L.M., Fertig S., Wang W.: Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 192–195 (2001)
59. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R.: Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, **435**, 1098–1101 (2005)
60. Reguera G., Nevin K.P., Nicoll J.S., Covalla S.F., Woodard T.L., Lovley D.R.: Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7345–7348 (2006)
61. Rodrigo M.A., Cañizares P., García H., Linares J.J., Lobato J.: Study of the acclimation stage and of the effect of the biodegradability on the performance of a microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* **100**, 4704–4710 (2009)
62. Rosenbaum M., Zhao F., Schröder U., Scholz F.: Interfacing electrocatalysis and biocatalysis with tungsten carbide: a high-performance, noble-metal-free microbial fuel cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 6658–6661 (2006)
63. Schaetzle O., Barrière F., Baronian K.: Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energy Environ. Sci.* **1**, 607–620 (2008)
64. Schröder U.: Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 2619–2629 (2007)
65. Shen Y.J., Lefebvre O., Tan Zi, Ng H.Y.: Microbial fuel-cell-based toxicity sensor for fast monitoring of acidic toxicity. *Water Sci. Technol.* **65**, 1223–1228 (2012)
66. Sikora A., Sikora R.: Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe. *Biotechnologia – Monografie*, **2**, 68–77 (2005)
67. Stein N.E., Hamelers H.M.V., van Straten G., Keesman K.J.: On-line detection of toxic components using a microbial fuel cell-based biosensor. *J. Process Control*, (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprocont.2012.07.009
68. Sun J., Li Y., Hu Y., Hou B., Xu Q., Zhang Y., Li S.: Enlargement of anode for enhanced simultaneous azo dye decolorization and power output in air-cathode microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* (2012), DOI 10.1007/s10529-012-1002-8
69. Sun Y., Wei J., Liang P., Huang X.: Electricity generation and microbial community changes in microbial fuel cells packed with different anodic materials. *Bioresour. Technol.* **102**, 10886–10891 (2011)

70. Tardast A., Najafpour G.D., Rahimnejad M., Amiri A.: Bioelectrical power generation in a membrane less microbial fuel cell. *World App. Sci. J.* **16**, 179–182 (2012)
71. Tender L.M., Gray S.A., Groveman E., Lowy D.A., Kauffman P., Melhado J., Tyce R.C., Flynn D., Petrecca R., Dobarro J.: The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. *J. Power Sources*, **179**, 571–575 (2008)
72. Tsai H.Y., Wu C.C., Lee C.Y., Shih E.P.: Microbial fuel cell performance of multiwall carbon nanotubes on carbon cloth as electrodes. *J. Power Sources*, **194**, 199–205 (2009)
73. Wang X., Feng Y.J., Lee H.: Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. *Water Sci. Technol.* **57**, 1117–1121 (2008)
74. Wang X., Cheng S., Zhang X., Li X., Logan B.E.: Impact of salinity on cathode catalyst performance in microbial fuel cells (MFCs). *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**, 13900–13906 (2011)
75. Wei J., Liang P., Huang X.: Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* **102**, 9335–9344 (2011)
76. Wen Q., Wu Y., Cao D., Zhao L., Sun Q.: Electricity generation and modeling of microbial fuel cell from continuous beer brewery wastewater. *Bioresour. Technol.* **100**, 4171–4175 (2009)
77. Wilkinson S.: "Gastrobots" – Benefits and challenges of microbial fuel cells in food powered robot applications. *Autonomous Robots*, **9**, 99–111 (2000)
78. Zhang X., Cheng S., Huang X., Logan B.E.: Improved performance of single-chamber microbial fuel cells through control of membrane deformation. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 1825–1828 (2010)
79. Zhang Y., Min B., Huang L., Angelidaki I.: Electricity generation and microbial community response to substrate changes in microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* **102**, 1166–1173 (2011)
80. Zhang G. Wang K., Zhao Q., Jiao Y., Lee D.J.: Effect of cathode types on long-term performance and anode bacterial communities in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* **118**, 249–256 (2012)
81. Zhuang L., Zhou S.: Substrate cross-conduction effect on the performance of serially connected microbial fuel cell stack. *Guangdong Institute of Eco-environmental and Soil Electrochemistry Comm.* **11**, 937–940 (2009)
82. Yang S., Du F., Liu H.: Characterization of mixed-culture biofilms established in microbial fuel cells. *Biomass Bioenergy*, (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.07.007
83. Yadav A.K., Dash P., Mohanty A., Abbassi R., Mishra B.K.: Performance assessment of innovative constructed wetland--microbial fuel cell for electricity production and dye removal. *Ecol. Eng.* **47**, 126–131 (2012)
84. You S., Zhao Q., Zhang J., Jiang J., Zhao S.: A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor. *J. Power Sources*, **162**, 1409–1415 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 41–52
http://www.pm.microbiology.pl

BUDOWA, REGULACJA I ZNACZENIE CZYNNIKÓW WIRULENCJI SZCZEPÓW *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Monika Łysakowska*[1], Monika Bigos[1], Małgorzata Wasiela[1]

[1] Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wpłynęło w styczniu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Czynniki wirulencji szczepów *S. agalactiae*. 3. Toksyny GBS. 3.1. β-hemolizyna/cytolizyna. 3.2. Czynnik CAMP. 4. Czynniki umożliwiające unikanie odpowiedzi układu odporności. 4.1. Otoczka. 4.2. Dysmutaza nadtlenkowa. 4.3. Peptydaza C5a. 4.4. Proteinaza serynowa. 5. Oporność na peptydy przeciwbakteryjne. 5.1. Białka wiążące penicyliny. 5.2. Fimbrie. 5.3. Antygen b. 6. Adhezja i wnikanie. 6.1. Białka wiążące fibrinogen. 6.2. Białko wiążące lamininę. 6.3. Białka bogate w powtórzenia seryny. 6.4. Immunogenna adhezyna GBS. 6.5. Białko αC (APC). 6.6. Białko IagA. 6.7. Białko powierzchniowe Rib. 7. Inne czynniki uczestniczące w patogenezie GBS. 7.1. Hialuronidaza. 7.2. Regulator transportu metioniny (MtaR). 7.3. Zdolność do wykorzystania hemu. 8. Podsumowanie

The structure, regulation and importance of *S. agalactiae* virulence factors

Abstract: The course of the disease caused by *S. agalactiae* seems to depend greatly on the presence of its diverse virulence factors. To the most important virulence factors belong: capsule, C5a peptidase, which inhibits the action of neutrophils, α-C protein, laminin binding protein, and *β* hemolysin typical for invasive strains. Additionally, GBS strains may present FbsA protein which protects bacteria from opsonization and fagocytosis as well as takes part in adhesion. FbsB protein facilitates invasion to epithelial cells. Some GBS strains are able to produce surface protein inactivatng chemokine, CspA. *S. agalactiae* strains naturally inhabit genital and digestive tract, but in certain circumstances may be responsible for varions infections, both in neonates and adults. It suggests that these bacteria are able to adapt to diffwrent environments in infected individual and proper expression of virulence factors, in response to diverse niches, makes their survival possible. The goal of this work is to present the current knowledge concerning the virulence factors of *S. agalactiae* and, at the same time, possible reasons why these pathogens are still causing life threatening infections, especially in neonates.

1. Introduction. 2. Virulence factors *S. agalactiae* strains. 3. GBS toxins. 3.1. β-haemolisin/cytolisin. 3.2. CAMP factor. 4. Factors make possible escape answer of immunity system. 4.1. Capsule. 4.2. Peroxide dysmutase. 4.3. C5a peptidase. 4.4. Serine peptidase. 5. Resistance to antibacterial peptides. 5.1. Penicilin binding proteins. 5.2. Fimbries. 5.3. Antigen b. 6. Adhesion and penetration. 6.1. Fibrinogen binding proteins. 6.2. Laminin binding proteins. 6.3. Serine reports wich proteins. 6.4. Immunogenic GBS adhesin. 6.5. αC (APC) protein. 6.6. IagA protein. 6.7. Surface Rib protein. 7. Other patogenic GBS factors. 7.1. Hialuronidase. 7.2. Metionine transport regulator (MtaR). 7.3. Heme use ability. 8. Summary

Słowa kluczowe: czynniki wirulencji, regulacja, *S. agalactiae*, GBS
Key words: virulence factors, regulator genes, *S. agalactiae*, GBS

1. Wstęp

Gram-dodatnie ziarniaki *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus Group B, GBS) stanowią naturalną florę pochwy u około 25% zdrowych kobiet [12]. Pomimo znaczących postępów w leczeniu zakażeń powodowanych przez szczepy GBS, nadal notuje się przypadki zakażeń śmiertelnych w wyniku transmisji bakterii do noworodków podczas porodu. W postaci wcześnie manifestującego się zakażenia obserwuje się niewydolność oddechową i zapalenie płuc, rozwijające się w bakteriemię i szok septyczny. Późno manifestującą się infekcję charakteryzuje zakażenie krwi z wysokim ryzykiem rozwinięcia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Szczepy *S. agalactiae* powodują również zakażenia u osób dorosłych, szczególnie u osób starszych, osłabionych, chorych na cukrzycę, czy nowotwory [21, 25]. Objawy kliniczne infekcji mogą być wtedy zróżnicowane i obejmować skórę, tkanki miękkie i zakażenia układu moczowego, bakteriemię, zapalenie płuc, zapalenie stawów oraz zapalenie wsierdzia.

Przebieg choroby powodowanej przez szczepy *S. agalactiae* wydaje się być w dużym stopniu warunkowany posiadaniem przez nie różnorodnych czynników wirulencji. Zalicza się do nich: zdolność do wytwarzania otoczki, możliwość syntezy peptydazy C5a, hamującej rekrutację neutrofilów i odpowiadającej za wiązanie fibronektyny, ułatwiające wnikanie białko α-C, białko wiążące lamininę i uczestniczące w inwazji do komórek nabłonka Lmn, *β*-hemolizynę ułatwiającą niszczenie komórek, białko powierzchniowe obecne w szczepach inwazyjnych. Ponadto szczepy GBS mogą posiadać geny dla białek wiążących fibrynogen: FbsA i FbsB. Białko FbsA chroni drobnoustrój przed opsonizacją i fagocytozą oraz sprzyja adhezji do komórek nabłonka i ludzkich komórek śródbłonka mikronaczyń mózgu, tym samym ułatwia przeniknięcie bariery krew-mózg. Białko FbsB ułatwia natomiast inwazję do komórek nabłonka.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, pl. Hallera 1, 90-647 Łódź; tel/fax: 42 639 81; e-mail: monika.lysakowska@umed.lodz.pl

Niektóre szczepy są zdolne także do wytwarzania białka powierzchniowego CspA uczestniczącego w degradacji chemokin. Szczepy GBS naturalnie bytują w przewodzie rozrodczym i dalszych odcinkach przewodu pokarmowego, jako patogeny natomiast mogą powodować różnego rodzaju zakażenia. Sugeruje to, że bakterie te są zdolne do adaptowania się do zmieniających się warunków otoczenia, a właściwa ekspresja czynników wirulencji w odpowiedzi na środowisko bytowania umożliwia szczepom GBS przeżycie w infekowanym organizmie.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wiedzy na temat czynników zjadliwości, które powodują, że szczepy *S. agalactiae* nadal pozostają patogenami powodującymi groźne, szczególnie u noworodków, zakażenia.

2. Czynniki wirulencji szczepów *S. agalactiae*

3. Toksyny GBS

Toksyny powodujące uszkodzenia błony ułatwiają wniknięcie drobnoustroju do komórki gospodarza, sprzyjają ich wewnątrzkomórkowemu przeżyciu i szerzeniu się w obrębie organizmu zainfekowanego. Szczepy *S. agalactiae* mogą wytwarzać dwie takie toksyny, β-hemolizynę/cytolizynę (β-H/C) i czynnik *Christie – Atkins – Munch Peterson* (CAMP).

3.1. β-hemolizyna/cytolizyna

β-hemolizyna/cytolizyna (β-H/C), znana również jako CylE, jest toksyną powierzchniową, odpowiedzialną za pojawienie się charakterystycznej strefy „β-hemolizy" na agarze z krwią. Stwierdzono, że zdolność do syntezy toksyny była ściśle związana z pojawieniem się niedociśnienia tętniczego, jak również wzrostem śmiertelności [52, 79]. Wczesne zmiany apoptotyczne obserwowane w kardiomiocytach obejmowały podwyższoną aktywność skurczową i wzrost poziomu wapnia, co wiązało się z wejściem komórek na ścieżkę apoptozy [61]. H e n s l e r i wsp. wykazali, że wydzielanie i akumulowanie β-H/C w czasie zakażenia noworodków powodowało zmiany w gospodarce wapniowej i prowadziło lokalnie do śmierci komórek tkanki serca, a tym samym do zaburzeń funkcji miokardium i śmierci [35]. Ponadto β-H/C sprzyjała inwazji szczepów GBS do komórek nabłonka i śródbłonka płuc oraz umożliwiała przenikanie bariery krew-mózg [19, 68]. Toksyna ułatwiała również rozwój niewydolności wątroby i indukowała odpowiedź zapalną, która przyczyniała się do powstania zaburzeń neurologicznych [35]. Wykazano, że β-H/C uszkadzała komórki śródbłonka mózgu oraz makrofagi [79]. Cytolizyna ta przyczynia się zatem na wiele sposobów do pojawienia się objawów wczesnego zakażenia szczepami *S. agalactiae*. Niektóre leki, np. fosfolipid DPPC, które hamują cytotoksyczną aktywność β-H/C, mogą zapobiegać pojawieniu się zaburzeń funkcji serca i innych organów w czasie zakażeń [35].

S p e l l e r b e r g i wsp. zidentyfikowali klaster genów konieczny do prawidłowego działania cytolizyny *S. agalactiae* [97]. Składa się on z przynajmniej 12 otwartych ramek odczytu, należących do operonu *cyl* i obejmuje białka transporterowe ABC (*cylA*, *cylB*), gen białka nośnikowego (*acpC*), geny białek związanyvh z syntezą kwasów tłuszczowych (*cylD*, *cylG*, *cylZ*, i *cylI*), aminometylotransferazy (*cylF*) i glikozyltransferazy (*cylJ*) [27]. Ponadto zawiera geny specyficzne dla szczepów GBS, w tym *cylE* będący genem strukturalnym toksyny [74, 97]. Inne geny tego operonu, *cylA* (komponenta wiążąca ATP), *cylB*, *cylJ* i *cylK,* uczestniczą w potranslacyjnej modyfikacji i wydzielaniu β-H/C [27, 30]. Dzięki inaktywacji poszczególnych genów operonu (*acpC*, *cylZ*, *cylA*, *cylB*, *cylE*, *cylF*, *cylI*, i *cylK*) stwierdzono, że większość mutantów charakteryzował fenotyp hypohemolityczny, poza mutantem *cylE,* który okazał się niehemolityczny [30].

Wykazano, że synteza β-H/C jest związana z produkcją pomarańczowego pigmentu, który jest odpowiedzialny za oporność bakterii na reaktywne formy tlenu (ROS) [52]. Uczestniczą w tym procesie produkty genów *cylJ* i *cylK*. Stwierdzono, że delecja genów struktury β-H/C (*cylE*) znosiła ekspresję pigmentu [23].

Dane wskazują, że szczepy *S. agalactiae* regulują ekspresję β-hemolizyny i związanego z nią pigmentu przez systemy transdukcji sygnału (*signal transduction systems,* STS). Systemy te odpowiadają na sygnały zewnętrzne i regulują funkcje czynników transkrypcji związanych z DNA. Najpowszechniejszymi STS u bakterii są systemy dwuczęściowe (*Two-component systems*, TCS), składające się ze związanego z błonami sensora kinazy histydynowej (HK) rozpoznającego sygnał zewnętrzny i fosforylującego pokrewne regulatory odpowiedzi (*Response regulators*, RR). Ta fosforylacja zwykle zmienia powinowactwo DNA do wiązania RR i zmienia ekspresję genów, by umożliwić adaptację do zmian środowiskowych. W przypadku szczepów *S. agalactiae* tylko rola czterech z 20 badanych TCS (CovR/CovS, DltR/DltS, RgfC/RgfA i CiaR/CiaH) jest poznana [37, 45, 76, 98, 104, 105]. Szczepy GBS kodują ponadto przynajmniej sześć regulatorów transkrypcji, które regulują ekspresję genów w odpowiedzi na zmiany w cytozolu, czy środowisku zewnętrznym [106].

Stwierdzono, że TCS hamujący transkrypcję genów *cyl,* w tym *cylE* i aktywujący ekspresję CAMP, składa się z RR, CovR i białek sensorowych HK oraz CovS. CovR hamował transkrypcję przez wiązanie się do promotora β-H/C (P*cylX*) [77]. CovS fosforylował CovR, co wzmacniało represję β-H/C [50]. Wykazano również, że kinaza seryna/treonina Stk1, może fosforylować CovR, obniżając fosforylację asparaginianu i wiązanie promotora. W konsekwencji Stk1 hamowała represję β-H/C przez CovR i aktywację czynnika CAMP [50, 77].

3.2. Czynnik CAMP

Czynnik CAMP jest białkiem wydzielniczym, kodowanym przez gen *cfb,* zdolnym do niszczenia błon komórkowych [71]. Białko zostało po raz pierwszy opisane przez Christie, Atkins i Munch-Peterson w 1944 roku, jako powodujące lizę czerwonych krwinek baranich w kombinacji z toksyną *Staphylococcus aureus* [36].

Wykazano, że podanie częściowo oczyszczonego czynnika CAMP powodowało zgon królików, a w połączeniu z subletalną dawką szczepów *S. agalactiae* indukowało sepsę i śmierć u myszy [40]. Mogło to wynikać z mechanizmu działania toksyny, która oligomeryzuje a następnie tworzy pory w komórkach docelowych wiążąc się do rdzenia cukrowego białek połączonych z GPI (glikozylofosfatydyloinozytol) [46]. Jednakże mutanty delecyjne nie były atenuowane [36], co sugeruje że czynnik CAMP nie jest konieczny w patogenezie zakażeń szczepami GBS (w przypadku serotypów Ia, V, III nie obserwowano ekspresji CAMP) [46, 77]. Jest również prawdopodobne, że zdolność szczepów GBS do syntezy β-H/C kompensuje brak CAMP w czasie infekcji. Zatem CAMP mógłby być istotny dla szczepów GBS w przypadku tych nisz, gdzie aktywność β-H/C jest zmniejszona, np. surfaktantu ludzkich płuc.

Stwierdzono, że szczepy GBS regulują β-H/C i czynnik CAMP dzięki CovR/S i Stk1. Wiążące pośrednio promotor genu czynnika CAMP (*cfb*) białko *CovR* aktywowało ekspresję CAMP u szczepów *S. agalactiae* [37, 38, 46]. Fosforylacja asparaginianu CovR przez kinazę CovS wzmacniała działanie CovR prowadząc do wzmożonej aktywacji CAMP, podczas gdy fosforylacja treoniny CovR przez Stk1 obniżała pośredniczoną przez CovR aktywację czynnika CAMP [77].

4. Czynniki umożliwiające unikanie odpowiedzi układu odporności

Szczepy GBS kodują liczne czynniki, które zapobiegają jego rozpoznaniu przez mechanizmy obronne gospodarza bądź zapewniają przeciw niemu oporność.

4.1. Otoczka

Szczepy GBS mogą posiadać 9 serotypów otoczkowych: Ia, Ib i II–IX. Wielocukier otoczkowy jest jednym z głównych czynników zjadliwości szczepów GBS, ale również celem dla przeciwciał opsonizujących [15]. Jako, że otoczka zawiera kwas sjalowy, organizm zakażony ma trudności w rozpoznaniu i eliminacji bakterii. Wykazano, że obecność otoczki zapobiega odkładaniu czynnika C3 i fagocytozie [59]. Stwierdzono także, że transfer przez łożysko przeciwciał matki chronił noworodka przed inwazyjnym zakażeniem szczepami GBS, a noworodki urodzone przez matki z niskim poziomem przeciwciał przeciw otoczkowych były bardziej narażone na zakażenia tymi bakteriami [2].

Strukturalne zróżnicowanie wielocukrów budujących otoczkę jest związane z różnorodnością genetyczną jej locus, najprawdopodobniej osiąganą w wyniku horyzontalnego transferu genów [60]. Zarówno blisko, jak i dalece spokrewnione klony mogą posiadać geny kodujące poszczególne typy otoczkowe, co sugeruje wymianę genów otoczkowych *in vivo* [26]. Fragmenty DNA otaczające locus otoczki są wysoce konserwatywne pomiędzy izolatami *S. agalactiae* [60], zatem rekombinacja homologiczna w tych regionach może przebiegać niezależnie od rekombinacji w innych regionach genomu bakterii. Wykazano, że obszar otaczający locus otoczki wykazuje dużą częstość zdarzeń rekombinacji, w tym dużych (334 kb) fragmentów DNA [9]. Sugeruje się, że przełączanie genów otoczki (*capsular switching*) przyczynia się do powstania nowych kombinacji serotyp-genotyp, jednocześnie umożliwiając unikanie presji selekcyjnej. Martins i wsp. udowodnili występowanie zmian otoczki u szczepów *S. agalactiae* i wykazali, że wymiana całych locus była bardziej powszechna niż przełączanie specyficznych genów otoczki. Stwierdzili zachodzenie *capsular switching* wśród szczepów GBS, ale z mniejszą częstością niż sądzono wcześniej [60].

Jak dotąd niewiele jest wiadomo o regulacji CPS w trakcie zakażenia. Wykazano, że CPS bierze udział w adhezji bakterii i wnikaniu do komórek nabłonka i śródbłonka. Sugeruje się, że szczepy *S. agalactiae* mogą regulować ekspresję genów otoczki w odpowiedzi na warunki środowiska zewnętrznego. Różnice w czasie podziału, czy zmiany w tempie wzrostu mogą wpływać na obecność CPS i przyleganie oraz wnikanie szczepów GBS do nabłonka układu oddechowego [56]. Stwierdzono, że RogB, regulator transkrypcji należący do rodziny białek RofA-like reguluje transkrypcję genów *cps* [31]. Wydaje się, że RogB jest represorem, bądź negatywnym regulatorem CPS, ponieważ transkrypcja pierwszego genu w operonie *cpsA* wzmagała się przy braku RogB w przypadku serotypu III. Również CovR/S nieznacznie regulował transkrypcję *cps* w sposób zależny od szczepu [77].

Szczepy GBS serotypuje się na podstawie różnic w budowie otoczki, dalsza charakterystyka zróżnicowania GBS opiera się już na użyciu metod genotypowych. Nie stwierdzono całkowitej korelacji pomiędzy typem otoczkowym a określonym przez MLST (Multi-locus Sequence Typing) [8]. Co więcej, porównawcze analizy genomów izolatów o różnych serotypach wykazały, że niekiedy posiadają one więcej takich samych genów niż szczepy tego samego serotypu [105]. Sugeruje to, że blisko, jak i odlegle spokrewnione klony mogą posiadać geny kodujące poszczególne typy otoczkowe, zatem może zachodzić ich wymiana *in vivo* [57]. Zmianom

otoczki w wyniku rekombinacji homologicznej sprzyjałaby organizacja *locus* kodującego geny syntezy wielocukrów otoczkowych (*cps*), gdzie wysoce zmienny region określający serotyp (*cpsGcpsK*) jest otoczony genami konserwatywnymi, a to umożliwia wymiany centralnej części operonu *cps* [57].

4.2. Dysmutaza nadtlenkowa

Dzięki oporności na rodniki tlenowe syntetyzowane przez gospodarza bakterie mogą przeżyć w zakażonym organizmie. Szczepy GBS kodują zależną od Mn^{2+} dysmutazę nadlenkową, SodA, zapewniającą oporność na rodniki tlenowe, które mogą uszkadzać DNA, RNA, białka, czy lipidy komórek bakteryjnych [65].

Dysmutazy przekształcają rodnik tlenowy, bądź tlen zjonizowany (O_2^-) do tlenu cząsteczkowego (O_2) i H_2O_2, które są następnie metabolizowane przez katalazy, czy peroksydazy. Tym samym enzymy te umożliwiają patogenom uniknięcia działania stresu oksydacyjnego w czasie wybuchu tlenowego indukowanego fagocytowaniem bakterii [65]. Stwierdzono, że mutanty delecyjne *S. agalactiae sodA* były znacząco bardziej wrażliwe na działanie makrofagów oraz wykazywały obniżoną przeżywalność w krwi i mózgu myszy [73], ale nie w wątrobie, czy śledzionie. Sugeruje to, że zdolność do wytwarzania dysmutazy umożliwia drobnoustrojom przeżycie w specyficznych niszach. Dysmutaza SodA wydaje się odgrywać istotną rolę we wczesnej fazie infekcji, kiedy umożliwia pojawienie się dużej ilości bakterii we krwi, co sprzyja inwazji do mózgu, przetrwaniu w śledzionie i wątrobie.

Transkrypcja *sodA* u szczepów GBS jest pozytywnie regulowana przez RovS. W przypadku mutanta delecyjnego *rovS* obserwowano ponad dwukrotne zmniejszenie ekspresji tego genu [87].

4.3. Peptydaza C5a

Peptydaza C5a (ScpB) paciorkowców jest związaną z powierzchnią komórki bakteryjnej proteinazą serynową, zdolną do inaktywacji komponentu C5a ludzkiego dopełniacza. Peptydaza ScpB, kodowana przez gen *scpB* [13] była po raz pierwszy zsekwencjonowana w szczepie serotypu II [14], obecnie stwierdza się przynajmniej 96% zgodności w sekwencji aminokwasowej dotąd zsekwencjonowanych peptydaz [14]. Sugeruje się zachodzenie transferu horyzontalnego genu peptydazy C5a pomiędzy gatunkami paciorkowców ropotwórczych [28]. Konserwatywna sekwencja, silna ekspresja i lokalizacja na powierzchni komórki czyni to białko dobrym kandydatem na szczepionkę [13, 90]. Wykazano, że podawanie szczepionek zawierających ScpB, bądź koniugaty ScpB-CPS powodowało eradykację szczepów *S. agalactiae* z płuc [13].

Jako, że C5a jest czynnikiem ważnym dla rekrutacji neutrofilów, jego degradacja zaburza tę funkcję [100]. W oparciu o użycie myszy *knockout* syntetyzujących ludzki C5a, stwierdzono, że aktywność peptydazy ScpB specyficznie inaktywuje ludzkie, ale nie mysie C5a [7]. ScpB może także ułatwiać wiązanie się szczepów GBS ludzkich komórek nabłonka i białek macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix*, ECM) [5]. Wykazano, że zdolność ScpB do wiązania fibronektyny była niezależna od jej aktywności jako peptydazy, ponieważ polimorfizm genu wpływał na aktywność peptydazy, ale nie na zdolność wiązania fibronektyny [102].

W czasie fazy wzrostu obserwowano nasilenie transkrypcji genu *scpB,* jak również wiązania do fibronektyny. Wykazano, że transkrypcja tego genu jest pod wpływem dwóch niezależnych TCS. Pierwszym z nich jest RgfC, sensor HK. U mutantów delecyjnych *rgfC* obserwowano zwiększenie wiązania się do fibronogenu [98]. Nie wiadomo jednak, czy RgfA pośrednio wiąże się do promotora *scpB* w celu represji jego transkrypcji. Sugeruje się natomiast zależną od fazy wzrostu represję ScpB przez RgfC/A i RgfB [98].

Kolejnym TCS, który reguluje ekspresję ScpB jest CovR/S. J i a n g i wsp. zaobserwowali 11–30-krotny wzrost transkrypcji genu *scpB* u mutantów delecyjnych *covR* serotypów Ia i V *S. agalactiae* [37]. Sugeruje to rolę CovR, jako represora ScpB, podobnie zresztą jak β-H/C. Stwierdzono, że ScpB nie stanowiło jednak części konserwatywnego regulonu CovR [38].

4.4. Proteinaza serynowa

Z powierzchnią komórki jest również związane inne białko, proteinaza serynowa CspA o masie 153-kDa, kodowana przez gen *cspA,* otoczony genami *cepA* i *cepI* [33]. Wydaje się, że miejsca od 1 do 44 białka stanowią region sygnałowy CspA (SS) [94] a D180 i S575 są jego miejscami katalitycznymi [10].

Szczepy GBS mogą dzięki tej proteinazie degradować komponenty ECM. Cięcie fibrynogenu (cięciu ulega podjednostka A), czy fibryno-podobnych składowych, utrudnia rozpoznanie bakterii i fagocytozę. Szczepy nie syntetyzujące proteinazy CpsA są podatne na działanie neutrofilów i charakteryzuje je obniżona wirulencja [33]. Wykazano, że CpsA degradują chemokiny, takie jak onkogenny czynnik wzrostu-γ, aktywujący neutrofile peptyd-2 i białko chemotaktyczne dla granulocytów-2 oraz znoszą ich zdolność do rekrutacji i aktywacji neutrofilów [10]. Stwierdzono, że szczepy GBS syntetyzowały jednocześnie proteinazy CspA oraz C5a, by unikać, bądź opóźniać aktywację neutrofilów. CspA prawdopodobnie nie niszczy IL-8, pomimo, że jej struktura jest podobna do innych ciętych przez CspA chemokin [109]. Sugeruje się, że mogą to uniemożliwiać niewielkie różnice struktury, bądź specyficzne aminokwasy w IL-8.

Obie proteinazy syntetyzowane przez szczepy *S. agalactiae* (ScpB i CspA) mają motyw kotwiczący LPXTG, który jest konieczny do ukierunkowania tych enzymów

na ścianę komórkową przez sortazę, SrtA [20]. Pomimo, że szczepy delecyjne GBS *srtA* cechowała zmieniona lokalizacja ScpB, zmniejszona ilość pili i zdolność do adhezji, nie były one mniej zdolne do powodowania zakażeń ogólnoustrojowych [44].

5. Oporność na peptydy przeciwbakteryjne

5.1. Białka wiążące penicyliny

Bakteryjne białka wiążące penicyliny (PBPs) uczestniczą w syntezie peptydoglikanu i wykazują aktywność przeciw antybiotykom β-laktamowym [110]. Jak dotąd nie stwierdzono oporności na penicyliny wśród szczepów GBS, jednakże szczepy o obniżonej wrażliwości były już opisywane [66]. Szczepy GBS z delecją genu *ponA,* który koduje PBP1a, okazały się podobnie wrażliwe na penicylinę do szczepów dzikich. Mutant *ponA* był atenuowany w modelu sepsy u noworodków i jednocześnie eliminowany szybciej z płuc noworodków szczurzych. Wykazywał podwyższoną wrażliwość na zabijanie przez neutrofile i makrofagi alweolarne (niezależnie od obecności otoczki) [39], co wynikało z faktu, że mutanty *ponA* GBS były bardziej wrażliwe na różne rodzaje AMPs [32]. Ponadto wykazano, że inne z białek, zmienione PBP 2X odpowiadały w dużym stopniu za zmniejszoną wrażliwość szczepów *S. agalactiae* na antybiotyki β-laktamowe, co wynikało ze zmiany niektórych aminokwasów w PBP [42]. Podstawienia nie dotyczyły regionów konserwatywnych białek [67]. Jak dotąd systemy regulatorowe odpowiedzialne za transkrypcję *ponA* nie zostały zidentyfikowane.

5.2. Fimbrie

Badania wykazują, że szczepy GBS kodują fimbrie, które pośredniczą w oporności na działanie AMPs i uczestniczą w przyleganiu do komórek gospodarza [55]. Fimbrie typów 1, 2a i 2b [82] są kodowane przez trzy loci. U szczepów dotąd badanych stwierdzano występowanie jednego lub dwóch z nich. Fimbrie typu 2a, mogące występować w siedmiu wariantach sekwencji aminokwasowych, wydają się typem najpowszechniej występującym (u ponad 70% analizowanych szczepów), natomiast dwa pozostałe typy stwierdzono u 27% szczepów GBS [58].

Wykazano, że tylko typ fimbrii 2a uczestniczy w tworzeniu biofilmu u izolatów *S. agalactiae* [78]. Sugeruje się, że w przypadku braku obecności fimbrii typu 2a, ekspresji ulega inny czynnik wirulencji o podobnych funkcjach i kompensuje ich brak. Wszystkie mutacje, które znoszą ekspresję fimbrii (delecje w genach białka, czy genach kodujących sortazę) bądź utrudniające wiązanie się ich do ściany komórkowej (delecje w genach AP2, srtC-1, srtA) zapobiegają formowaniu się biofilmu. Natomiast inaktywacja białka AP1, jednej ze składowych fimbrii 2a, podobnie jak utrata AP1-specyficznej sortazy-C (SrtC-2), nie wpływa na zdolność do adhezji i agregacji szczepów GBS [82].

Zaobserwowano, że delecja całego genu *pilA* (homolog AP1 u szczepu GBS 515) powodowała utratę zdolności do syntezy biofilmu, natomiast delecja genu *pilC* (homolog AP2 u GBS 515) nie wpływała na tworzenia biofilmu [43]. Powodem tych rozbieżnych wyników może być fakt, że szczepy GBS 515 i GBS NEM316 posiadają fimbrie 2a należące do różnych wariantów, które strukturalnie mogą różnić się w zdolności do agregacji i adhezji [58]. Szczepy GBS pozbawione *pilB* wykazywały obniżony poziom wirulencji i zwiększoną podatność na fagocytozę i AMPs [55]. PilC natomiast nie wykazywały roli kotwiczącej swojego homologa AP2-2a i w odróżnieniu od AP2-2a, były wyrażane na powierzchni komórki bakteryjnej [78].

Wszystkie trzy typy fimbrii wzbudzały syntezę przeciwciał a szczepionki oparte na ich komponentach zapewniały ochronę przed zakażeniem powodowanym przez szczepy GBS u badanych myszy [58].

Wydaje się, że gen RogB reguluje dodatnio ekspresję fimbrii u szczepów GBS, ponieważ transkrypcja PI-2a była obniżona przy jego braku [20]. Ze względu na fakt, że RogB nie jest fizycznie związany z PI-1, czy PI-2b, jest prawdopodobne, że te *loci* nie są przez niego regulowane [20, 69]. Stwierdzono także wpływ innego genu regulatorowego na ekspresję fimbrii *S. agalactiae*. Mutanty nie mające genu *rga* posiadały znacząco mniej fimbrii na powierzchni komórek [88].

5.3. Antygen b

Antygen b będący składową białka powierzchniowego C, ma możliwość wiązania przeciwciał IgA oraz czynnika H komplementu [1]. Jest on kodowany przez gen *bac* zlokalizowany na wyspie patogenności [17]. Wykazano, że gen *bac* występuje u 17.5% izolatów *S. agalactiae* [84]. U szczepów *S. agalactiae* 98-D60C i A909 został ostatnio zidentyfikowany dwuskładnikowy system regulatorowy kodujący sensor kinazy histydynowej (gen *sak*188) i wiążący DNA regulator odpowiedzi (gen *sak*189) [17, 104]. Stwierdzono, że transkrypcja genu *bac* i ekspresja antygenu b były kontrolowane przez regulator odpowiedzi Sak189 a regulacja odbywała się na poziomie transkrypcji. Stwierdzono ponadto, że Sak189, ale nie Sak188 wpływał na wirulencję *S. agalactiae in vivo* [83].

6. Adhezja i wnikanie

Szczepy GBS przylegają i wnikają do różnych komórek gospodarza, w tym do komórek nabłonka pochwy, nabłonka i śródbłonka płuc, czy komórek bariery krew-mózg. Wiąże się to z początkowym wiązaniem się

bakterii do białek takich, jak fibrinogen, fibronektyna, laminina, które następnie ułatwiają późniejsze interakcje z powierzchniowymi integrynami i wniknięcie do komórek gospodarza [54].

6.1. Białka wiążące fibrinogen

Ważną rolę w patogenezie zakażeń powodowanych przez szczepy *S. agalactiae* odgrywają adhezyny MSCRAMMs (*Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), które wiążą się specyficznie do fibrynogenu, fibronektyny, kolagenu, lamininy. Fibrynogen, jako ważna składowa surowicy krwi, jest często miejscem przyłączania dla adhezyn bakteryjnych. Wykazano, że wiązanie do fibrynogenu u szczepów *S. agalactiae* było pośredniczone przez dwa białka FbsA i FbsB [91]. FbsA to białko związane z powierzchnią komórki, kodowane przez niewiele szczepów GBS (np. serotyp Ia, III), podczas gdy FbsB było znajdowane u wszystkich szczepów dotąd zsekwencjonowanych [104].

Wykazano, że białko FbsA zawierało peptyd sygnałowy, region powtórzeń i C-koniec z motywem LPXTG typowy dla białek MSCRAMMs. Natomiast białko FbsB nie posiadało takiego motywu [31, 81], co sugerowało, że jest to białko wydzielane a nie związane z powierzchnią komórki. Pomimo, że obie adhezyjny wiązały fibrynogen, nie cechowała ich homologia sekwencji. Podczas, gdy białko FbsA składało się z powtórzeń (od 3–30) 16-aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie fibrynogenu (jedno powtórzenie jest zdolne go związać) [91], białko FbsB ich nie posiadało. Co więcej A r i b a m i wsp. stwierdzili, że adhezyna pochodząca z ludzkiego szczepu *S. agalactiae* NEM316, typu III, składała się z 635 aminokwasów (73 kDa), a jej region terminalny C nie wskazywał podobieństwa do innych już poznanych [16, 31].

Mutanty delecyjne GBS FbsA wykazywały obniżoną zdolność do wiązania ludzkiego fibrynogenu i większą wrażliwość na fagocytozę niż szczepy dzikie [91]. Mutanty delecyjne GBS FbsB nie były atenuowane pod względem wiązania fibrynogenu, ale zdolność inwazji do komórek nabłonka płuc była znacznie obniżona [50]. Sugeruje to, że białko FbsA pośredniczy w adhezji, a adhezyna FbsB promuje wniknięcie szczepów *S. agalactiae* do komórek gospodarza.

Regulacja ekspresji białka FbsA jest dokonywana przez RogB, RovS i CovR/S. Wykazano, że RogB pozytywnie regulowało transkrypcję genu *fbsA* [31], a mutanty GBS nie posiadające RogB wykazywały obniżoną transkrypcję *fbsA* i wiązanie fibrynogenu. Drugie z białek regulatorowych, RovS wiązało się bezpośrednio do promotora *fbsA* i negatywnie regulowało jego transkrypcję [87]. Mutanty *rovS* cechowała umiarkowanie większa zdolność wiązania fibrynogenu, jak i adhezji do komórek nabłonka płuc. Dodatkowo ekspresja RogB była również obniżona u mutantów *rovS,* chociaż RovS nie wiązał się bezpośrednio do regionu promotorowego *rogB* [87]. Białko FbsA było także negatywnie regulowane przez system CovR/S. Jak stwierdzono, transkrypcja *fbsA* wzrastała 4.6-krotnie przy braku regulatora CovR/S u serotypu III GBS, kodującego zarówno RogB, jak i RovS.

S a m e n i wsp. opisali ostatnio jeszcze jeden gen kodujący regulator transkrypcji ważny dla GBS, *rga*. Po jego delecji bakterie wykazywały obniżoną ekspresję genów *srr*-1 i *pilA* (kodujących glikoproteinę bogatą w powtórzenia serynowe i białko fimbrii) oraz lekko wzmożoną ekspresję genu *fbsA*, przy czym specyficznie regulator ten wiązał się do genów *fbsA* i *pilA*. Ponadto zaobserwowano zmniejszenie zdolności do wiązania się bakterii nie posiadających genu *rga* do komórek nabłonka HEp-2, komórek ludzkiej keratyny 4, natomiast zwiększoną zdolność wiązania się do komórek linii A549 i ludzkiego fibrynogenu [88].

6.2. Białko wiążące lamininę

Adhezja szczepów GBS do lamininy komórek gospodarza jest pośredniczona przez białko wiążące lamininę Lmb. Stwierdzono, że jest ono lipoproteiną wykazującą homologię do rodziny białek Lra1 odpowiedzialnych za adhezję i transport metali u bakterii Gram-dodatnich [28]. Gen *lmb* i zlokalizowany powyżej gen *scpB* oraz ORF2 są wspólnie transkrybowane [22]. Region międzygenowy *scpB-lmb* może zawierać dwa typy fragmentów ruchomych (*mobile genetic elements,* MGEs): GBSi1 lub IS1548 [29, 53], a są one zlokalizowane odpowiednio 97-bp i 9-bp powyżej promotora genu *lmb* [29].

Wykazano, że istotne klinicznie szczepy GBS linii CC17 posiadały GBSi1, linii CC19-IS1548, podczas gdy szczepy CC23 nie posiadały żadnego MGE [34]. W obrębie linii CC19 wszystkie szczepy o serotypie III miały IS1548 a szczepy serotypu II GBSi1 [85].

Stwierdzono, że mutanty delecyjne *lmb* GBS wykazywały obniżoną zdolność do adhezji do ludzkiej lamininy i do komórek mikronaczyń śródbłonka mózgu [96, 103]. Pomimo, że uważa się że Lmb promuje kolonizację i translokację GBS do strumienia krwi, mechanizmy tych procesów nie zostały poznane. Obecność regionu niekodującego o dł. około 200 bp pomiędzy *lmb* i *scpB* u serotypów Ia i III sugeruje jednak, że nie są one podobnie regulowane u tych szczepów.

6.3. Białka bogate w powtórzenia seryny

Białka bogate w powtórzenia serynowe (Srr) występujące u szczepów GBS, to kolejne czynniki wirulencji mogące odpowiadać za rozwój zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [95]. Są to wysoce glikozylowane, zlokalizowane na powierzchni białka, które

uczestniczą w adhezji [101]. Stwierdzono, że w wyniku potranslacyjnych zmian białko Srr-1 wykazuje podobieństwo do wzoru glikozylacji GspB u *S. gordonii* [95]. Mechanizm tego procesu nie jest znany, ale prawdopodobnie uczestniczy w nim kilka genów glikozylotransferaz usytuowanych w locus *srr1*. Wykazano, że białka te są zbudowane z pojedynczego peptydu o długości około 50 aminokwasów, regionu Srrs i motywu wiążącego ścianę komórkową LPXTG [92]. Wysoce konserwatywne białko Srr-1 wydaje się rozpowszechnione pomiędzy szczepami GBS, natomiast białko Srr-2 występowało u szczepów serotypu III i ST-17. Wraz z seryną w Srr-2 w regionach powtórzeń pojawiały się następujące aminokwasy: walina, izoleucyna, treonina asparagina, kwas glutaminowy, natomiast w białku Srr-1 alanina, treonina i metionina [92].

Geny inwazyjności pośredniczą w przenikaniu do komórek, np. komórek nabłonka płuc [19], zatem mogą być istotne we wczesnych etapach zakażenia u noworodków. Stwierdzono, że występujące powszechnie białko Srr-1 wiązało się do ludzkiej keratyny oraz umożliwiało adhezję do komórek HEp2. Mutant delecyjny *srr-1* wykazywał zmniejszoną zdolność do adhezji o 75%, ale nie do inwazji do komórek linii HEp2 [86]. Jak wykazano, szczepy GBS kodujące Srr-2 były bardziej wirulentne niż szczepy Srr-1 w przypadku sepsy u noworodków [92].

6.4. Immunogenna adhezyna GBS

Adhezja jest również ułatwiana przez immunogenną adhezynę (BibA) [89]. Szczepy GBS mogą kodować cztery formy białka BibA, związane ze ścianą komórkową, jak i wydzielane na zewnątrz komórki.

Jak dotąd, nie znaleziono powiązania pomiędzy występowaniem poszczególnych typów BibA a postacią choroby, czy nosicielstwem, jednakże zaobserwowano pewne zależności pomiędzy serotypami drobnoustrojów a typem białka BibA występującym u szczepów GBS [89]. Serotyp Ia znajdowano wyłącznie u szczepów posiadających wariant II białka BibA, podczas gdy szczepy serotypu Ib miały tylko wariant III białka BibA. Szczepy GBS należące do serotypu II posiadały głównie wariant III białka BibA, natomiast wśród szczepów serotypu III występowały warianty I i IV białka BibA. Wariant IV białka BibA występował wyłącznie wśród szczepów GBS linii ST-17, która powodującą często zakażenia u noworodków. Kilka szczepów GBS reprezentujących serotyp IV posiadało wariant II białka BibA, natomiast szczepy serotypu V zawierały głównie wariant III białka BibA [89].

W przypadku serotypu V, białko BibA ułatwiało adhezję szczepów GBS do ludzkich komórek szyjki macicy i nabłonka płuc, wiązało się do regulatora klasycznego komplementu znanego jako białko wiążące C4 i odpowiadało za oporność na fagocytozę [89]. Wykazano, że szczepienie myszy białkiem BibA daje odporność na zakażenie szczepami GBS. Niestety niemalże połowa badanych szczepów nie wyrażała tego białka na powierzchni komórek, zatem w tym przypadku ich zdolność do indukcji odporności była niska.

Stwierdzono, że gen *bibA* znajduje się pod wpływem negatywnej regulacji systemu CovS/CovR [45]. Jak dotąd, nie wiadomo jednak, jakie bodźce środowiskowe włączają aktywację tego systemu u szczepów GBS. Sugeruje się, że poziom ekspresji białka BibA na powierzchni komórki obserwowany *in vitro* jest niższy niż w zakażonym organizmie, co pozostaje zgodne z badaniami M e r e g h e t t i i wsp., którzy stwierdzili, że ekspresja białka BibA u szczepów izolowanych z krwi jest podwyższona w porównaniu do bakterii namnażanych *in vitro* [63].

6.5. Białko αC (APC)

Ważnym czynnikiem zjadliwości szczepów *S. agalactiae* jest kodowane przez gen *bca* białko powierzchniowe α-C (ACP), odpowiedzialne za inwazję do nabłonka szyjki macicy [3]. Jego aktywność wiąże się z liczbą powtórzeń tandemowych fragmentu 82-aminokwasowego, a zmienna długość tych fragmentów wynika z zachodzenia rekombinacji niezależnej od r*ecA* [72].

Stwierdzono, że białko ACP ulega ekspresji na powierzchni serotypów Ia, Ib I i II *S. agalactiae*, rzadko natomiast w przypadku serotypu III GBS [64]. Białko ACP ułatwiało wnikanie do komórek gospodarza w wyniku interakcji z glikozaminoglikanami komórek gospodarza [4] bądź dzięki wiązaniu się do α1β1-integryn na powierzchni komórek nabłonka [6].

Mechanizmy regulacji białka ACP pozostają niejasne. Wykazano dotąd, że delecja systemu regulacyjnego *covR/S* powodowała nieznaczny wzrost, bądź brak zmian ekspresji ACP [37, 45]. Regulacja transkrypcji odbywała się także w wyniku zmian w obrębie krótkich sekwencji powtarzalnych usytuowanych powyżej regionu -35 promotora [75], na drodze błędnego parowania w wyniku przesunięcia nici. Sugeruje się, że oba te procesy mogą powodować selekcję i ekspansję zmienionych izolatów [41].

6.6. Białko IagA

Białko IagA, kodowane przez gen *iagA*, zostało zidentyfikowany jako ważny czynnik wirulencji w zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych powodowanych przez szczepy GBS. Wykazano, że mutanty delecyjne *iagA* szczepów *S. agalactiae* powodowały bakteriemię u myszy podobnie jak u szczepów dzikich [18], jednakże wykazywały obniżoną zdolność do penetracji bariery krew mózg i były odpowiedzialne za mniejszy odsetek zakażeń śmiertelnych *in vivo* [18].

Stwierdzono, że białko IagA jest glikozylotransferazą (DGlcDAG), umożliwiającą wbudowywanie kwasu lipoteichojowego (LTA) w osłony komórkowe bakterii. W wyniku delecji genu *iagA*, wiązanie LTA było zaburzone i obserwowano jego uwalnianie do pożywki. D o r a n i wsp. sugerowali, że utrata zdolności syntezy DGlcDAG powodowała nie tylko usunięcie z powierzchni komórek GBS inwazyny IagA, ale również uwalniane LTA mogło blokować mechanizmy wnikania bakterii to ludzkich komórek mikronaczyń śródbłonka mózgu [18].

6.7. Białko powierzchniowe Rib

Białko powierzchniowe Rib, o tandemowo powtarzających się sekwencjach [107], jest znajdowane u znaczącego odsetka szczepów powodujących zakażenia inwazyjne noworodków [62, 84, 99]. Obecność tego białka, kodowanego przez gen *rib,* jest wykorzystywana przy serotypowaniu szczepów GBS [47, 51]. Jak wykazano, szczepienia myszy preparatami z oczyszczonego białka Rib chroniło przed zakażeniem śmiertelnym szczepem o podobnym białku [51]. Stwierdzono, że niskie stężenia przeciwciał przeciw białku Rib u noworodków mają związek z postacią inwazyjną zakażenia przez szczepy GBS wyrażające te białka. Sugeruje to, że naturalne przeciwciała przeciw białku Rib szczepów GBS mogą chronić przed zakażeniami szczepami *S. agalactiae* [51].

7. Inne czynniki uczestniczące w patogenezie GBS

7.1. Hialuronidaza

Wydzielnicza liaza, proteaza (HlyB), kodowana przez gen *hlyB*, jest czynnikiem patogenności [49], który umożliwia szerzenie się szczepów GBS podczas infekcji. Hialuronidaza degraduje kwas hialuronowy, budującą tkankę łączną i układ nerwowy oraz znajdujący się w łożysku, płynie owodniowym i płucach [48]. Stwierdzono, że szczepy *S. agalactiae* syntetyzujące większe ilości hialuronidazy cechowały się większą zjadliwością w porównaniu do szczepów niewiele jej syntetyzujących [80].

Działanie hialuronidazy syntetyzowanej przez szczepy *S. agalactiae* badano na modelu rodzinnej hypercholesterolemii. Wykazano, że HylB powodowała zniszczenie płytki miażdżycowej w badaniach *in vitro*, natomiast w badaniach *in vivo* spowalniała jej tworzenie [70].

7.2. Regulator transportu metioniny (MtaR)

Gen *mtaR S. agalactiae,* wykazujący podobieństwo do rodziny regulatorów transkrypcji LysR, jest regulatorem transportu metioniny. Wykazano, że inaktywacja tego genu zwiększała około 1000-krotnie LD50 dla szczepu *S. agalactiae*, ponadto mutanty namnażały się *in vivo* słabiej [93].

Stwierdzono, że regulator MtaR aktywował nie tylko ekspresję klasteru genów odpowiedzialnych za transport metioniny (*metQ1NP*), ale także w niewielkim stopniu powodował obniżenie syntezy argininy. Ponadto obniżał ekspresję proteinazy serynowej CspA a wzmagał produkcję adhezyny FbsB [11]. Sugeruje się, że zarówno obniżona zdolność do przyswajania metioniny, jak i obniżona synteza białka CpsA przyczynia się do zmniejszenia zjadliwości mutantów *mtaR* [11, 93]. MtaR nie wpływał natomiast na ekspresję genów *cps*, pomimo, że jest transkrybowany z tego operonu [93].

7.3. Zdolność do wykorzystania hemu

Szczepy *Streptococcus agalactiae* nie są zdolne do syntezy hemu, więc pobierają go z krwi w trakcie zakażenia. Zdolność do użycia hemu, jako źródła żelaza koniecznego w procesie oddychania jest korzystna, i jak wykazano, konieczna do pełnej wirulencji szczepów *S. agalactiae* w modelu sepsy [108]. Stwierdzono, że za utrzymanie homeostazy hemu i protoporfiryny IX (PPIX) u szczepów GBS odpowiada system składający się z operonów: gbs1753, gbs1752 (pefA i pefB), gbs1402 (pefR), gbs1401, gbs1400 (pefC i pefD). PefR jest represorem obu operonów. Bakterie z inaktywowanymi oboma systemami Pef okazały się wrażliwe na porfiryny, natomiast konstytutywna aktywność tych operonów w wyniku inaktywacji pefR doprowadziła do zaburzeń oddychania i obniżenia wirulencji patogenów [25].

8. Podsumowanie

Pomimo wykonywania badań przesiewowych szczepy *S. agalactiae* nadal pozostają ważnymi patogenami powodującymi groźne w skutkach zakażenia u noworodków. Dlatego też istotne wydaje się poszerzanie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów, które odpowiadają za ich zdolność do powodowania tych infekcji. W dużym stopniu za wirulencję odpowiadają posiadane przez bakterie czynniki zjadliwości. Zrozumienie powiązań pomiędzy ich występowaniem, serotypami drobnoustrojów mogłoby umożliwić różnicowanie szczepów inwazyjnych i kolonizujących.

Udowodniono, że szczepy GBS mogą dostosowywać ekspresję genów czynników zjadliwości do zmieniającego się środowiska bytowania oraz etapu zakażenia poprzez systemy transdukcji sygnałów. Wiedza ta może okazać się istotna podczas leczenia zakażeń powodowanych przez szczepy *S. agalactiae*, szczególnie w obliczu narastającej oporności bakterii.

Piśmiennictwo

1. Areschoug T., Stalhammar-Carlemalm M., Karlsson I., Lindahl G.: "Streptococcal β protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc," *J. Biol. Chem.* **277**, 12642–12648 (2002)
2. Baker C.J., Kasper D.L.: Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal Group B Streptococcal infection. *N. Engl. J. Med.* **294**, 753–756 (1976)
3. Baron M.J., Filman D.J., Prophete G.A., Hogle J.M., Madoff L.C.: Identification of a glycosaminoglycan binding region of the alpha C protein that mediates entry of group B streptococci into host cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 10526–10536 (2007)
4. Baron M.J., Bolduc G.R., Goldberg M.B., Auperin T.C., Madoff L.C.: αC protein of Group B Streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin--dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 24714–24723 (2004)
5. Beckmann C., Waggoner J.D., Harris T.O., Tamura G.S., Rubens C.E.: Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect. Immun.* **70**, 2869–2876 (2002).
6. Bolduc G.R., Madoff L.C.: The Group B Streptococcal α C protein binds α1β1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. *Microbiol.* **153**, 4039–4049 (2007)
7. Bohnsack J.F., Widjaja K., Ghazizadeh S., Rubens C.E., Hillyard D.R., Parker C.J., Albertine K.H., Hill H.R.: A role for C5 and C5a-ase in the acute neutrophil response to Group B streptococcal infections. *J. Infect. Dis.* **175**, 847–855 (1997)
8. Brochet M., Glaser P. i wsp: Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infect.* **8**, 1227–1243 (2006)
9. Brueggemann A.B., Griffiths D.T., Meats E., Peto T., Crook D.W., Spratt B.G.: Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J. Infect. Dis.* **187,** 1424–1432 (2003)
10. Bryan J.D., Shelver D.W.: *Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines. *J. Bacteriol.* **191**, 1847–1854 (2009)
11. Bryan J.D., Liles R., Cvek U., Trutschl M., Shelver D.: Global transcriptional profiling reveals *Streptococcus agalactiae* genes controlled by the MtaR transcription factor. *BMC Genomics*, **9**, 607 (2008)
12. Campbell J.R., Hillier S.L., Krohn M.A., Ferrieri P., Zaleznik D.F., Baker C.J.: Group B Streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet. Gynecol.* **96**, 498–503 (2000)
13. Cheng, Q., Debol S., Lam H., Eby R., Edwards L., Matsuka Y., Olmsted S.B., Cleary P.P.: Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of group B streptococci from lungs of infected mice. *Infect. Immun.* **70**, 6409–6415 (2002)
14. Chmouryguina I., Suvorov A., Ferrieri P., Cleary P.P.: Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. Infect. Immun. **64**, 2387–2390 (1996)
15. Davies H. D., Raj S., Adair C., Robinson J., McGeer A.: Population-based active surveillance for neonatal group B streptococcal infections in Alberta, Canada: implications for vaccine formulation. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**, 879–884 (2001)
16. Devi A.S., Ponnuraj K.: Cloning, expression, purification and ligand binding studies of novel fibrinogen-binding protein FbsB of *Streptococcus agalactiae*. *Protein Expr. Purif.* **74**, 148–55 (2010)
17. Dmitriev A., Yang Y.N., Shen A.D., Totolian A.: Adjacent location of bac gene and two-component regulatory system genes within the putative *Streptococcus agalactiae* pathogenicity island. *Folia Microbiol.* (Praha), **51**, 229–235 (2006)
18. Doran K.S., Nizet V. i wsp.: Blood-brain barrier invasion by Group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J. Clin. Invest.* **115**, 2499–2507 (2005).
19. Doran K.S., Liu G.Y., Nizet V.: Group B streptococcal β-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J. Clin. Inv.* **112**, 736–744 (2003)
20. Dramsi S., Caliot E., Bonne I., Guadagnini S., Prévost M.C., Kojadinovic M., Lalioui L., Poyart C., Trieu-Cuot P.: Assembly and role of pili in Group B Streptococci. *Mol. Microbiol.* **60**, 1401–1413 (2006)
21. Edwards M.S., Baker C.J.: Group B Streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 839–847 (2005)
22. Elsner A., Kreikemeyer B., Braun-Kiewnick A., Spellerberg B., Buttaro B.A., Podbielski A.: Involvement of Lsp, a member of the raIlipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. *Infect. Immun.* **70**, 4859–4869 (2002)
23. Fang F.C.: Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–832 (2004)
24. Farley M.M.: Group B Streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 556–561 (2001)
25. Fernandez A., Lechardeur D., Derré-Bobillot A., Couvé E., Gaudu P., Gruss A.: Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000860 (2010)
26. Figueira-Coelho J., Ramirez M., Salgado M. J., Melo-Cristino J.: *Streptococcus agalactiae* in a large Portuguese teaching hospital: antimicrobial susceptibility, serotype distribution, and clonal analysis of macrolideresistant isolates. *Microb. Drug Resist.* **10**, 31–36 (2004)
27. Forquin M.P., Tazi A., Rosa-Fraile M., Poyart C., Trieu-Cuot P., Dramsi S.: The putative glycosyltransferase-encoding gene *cylJ* and the Group B *Streptococcus* (GBS)-specific gene *cylK* modulate hemolysin production and virulence of GBS. *Infect. Immun.* **75**, 2063–2066 (2007)
28. Franken C., Haase G., Brandt C., Weber-Heynemann J., Martin S., Lammler C., Podbielski A., Lutticken R., Spellerberg B.: Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing scpB and lmb. *Mol. Microbiol.* **41**, 925–935 (2001)
29. Granlund M., Michel F., Norgren M: Mutually exclusive distribution of IS1548 and GBSi1 an active group II intron identified in human isolates of group B streptococci. *J. Bacteriol.* **183**, 2560–2569 (2001)
30. Gottschalk B., Broker G., Kuhn M., Aymanns S., Gleich--Theurer U., Spellerberg B.: Transport of multidrug resistance substrates by the *Streptococcus agalactiae* hemolysin transporter. *J. Bacteriol.* **188**, 5984–5992 (2006)
31. Gutekunst H., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J.: The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**, 3495–504 (2004)
32. Hamilton A., Popham D.L., Carl D.J., Lauth X., Nizet V., Jones A.L.: Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of Group B *Streptococcus* to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **74**, 6179–6187 (2006)
33. Harris T. O., Shelver D. W., Bohnsack J. F., Rubens C. E.: A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J. Clin. Inv.* **111**, 61–70 (2003)

34. Hery-Arnaud G., Mereghetti L., i wsp.: Mobile genetic elements provides evidence for a bovine origin of clonal complex 17 of *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4668–4672 (2007)
35. Hensler M.E., Miyamoto S., Nizet V.: Group B Streptococcal β-hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function. *PLoS ONE* **3**, e2446 (2008)
36. Hensler M., Quach D., Hsieh Chia-Jun., Doran K.S., Nizet V.: CAMP Factor is Not Essential for Systemic Virulence of Group B. *Streptococcus. Microb Pathog.* **44**, 84–88 (2008)
37. Jiang S.M., Cieslewicz M.J., Kasper D.L., Wessels M.R.: Regulation of virulence by a two-component system in Group B Streptococcus. *J. Bacteriol.* **187,** 1105–1113 (2005)
38. Jiang S.M., Ishmael N., Hotopp J.D., Puliti M., Tissi L., Kumar N., Cieslewicz M.J., Tettelin H., Wessels M.R.: Variation in the Group B *Streptococcus* CsrRS regulon and effects on pathogenicity. *J. Bacteriol.* **190**, 1956–1965, (2008)
39. Jones A.L., Mertz R.H., Carl D.J., Rubens C.E.: A streptococcal penicillin-binding protein is critical for resisting innate airway defenses in the neonatal lung. *J. Immunol.* **179**, 3196–3202 (2007)
40. Jurgens D., Sterzik B., Fehrenbach F.J.: Unspecific binding of Group B Streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J. Exp. Med.* **165**, 720–732 (1987)
41. Klinzing D.C., Madoff L.C., Puopolo K.M.: Genomic analysis identifies a transcription-factor binding motif regulating expression of the alpha C protein in Group B *Streptococcus*. *Microb Pathog.* **46**, 315–320 (2009)
42. Kimura K., Suzuki S., Wachino J., Kurokawa H., Yamane K., Shibata N., Nagano N., Kato H., Shibayama K., Arakawa Y.. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob. *Agents Chemother.* **52**, 2890–2897 (2008)
43. Konto-Ghiorghi Y., Mairey E., Mallet A., Dumenil G., Caliot E., Trieu-Cuot P., Dramsi S.: Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog. **5**, e1000422 (2009)
44. Lalioui L., Pellegrini E., Dramsi S., Trieu-Cuot P.: The SrtA sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect. Immun.* **73**, 3342–3350 (2005)
45. Lamy M.C., Poyart C., i wsp. CovS/CovR of Group B *Streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol. Microbiol.* **54**, 1250–1268 (2004)
46. Lang S., Xue J., Guo Z., Palmer M.: *Streptococcus agalactiae* CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. *Med. Microbiol. Immunol.* **196**, 1–10 (2007)
47. Larsson C., Lindroth M., Nordin P., Stålhammar-Carlemalm M., Lindahl G., Krantz I.: Association between low concentrations of antibodies to protein α and Rib and invasive neonatal group B streptococcal infection. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.* **91**, F403–F408 (2006)
48. Li S., Jedrzejas M.J.: Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem.* **276**, 41407–41416 (2001)
49. Lin B., Hollingshead S.K., Coligan J.E., Egan M.L., Baker J.R., Pritchard D.G.: Cloning and expression of the gene for Group B Streptococcal hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem.* **269**, 30113–30116 (1994)
50. Lin W.J., Walthers D., Connelly J.E., Burnside K., Jewell K.A., Kenney L.J., Rajagopal L.: Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Mol. Microbiol.* **71**, 1477–1495 (2009)
51. Lindahl G., Stålhammar-Carlemalm M., Areschoug T.: Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 102–127 (2005)
52. Liu G.Y., Doran K.S., Lawrence T., Turkson N., Puliti M., Tissi L., Nizet V.: Sword and shield: linked Group B Streptococcal β-hemolysin/ cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **101**, 14491–14496 (2004)
53. Luan S.L., Granlund M., Norgren M.: An inserted DNA fragment with plasmid features is uniquely associated with the presence of the GBSi1 group II intron in *Streptococcus agalactiae*. *Gene*, **312**, 305–312 (2003)
54. Maisey H.C., Quach D., Hensler M.E., Liu G.Y., Gallo R.L., Nizet V., Doran K.S.: A Group B Streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J.* **22**, 1715–1724. 2008
55. Maisey H.C., Hensler M., Nizet V., Doran K.S.: Group B Streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.* **189**, 1464–1467 (2007)
56. Malin G., Paoletti L.C.: Use of a dynamic *in vitro* attachment and invasion system (DIVAS) to determine influence of growth rate on invasion of respiratory epithelial cells by Group B *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **98**, 13335–13340 (2001)
57. Manning S.D., Springman A.C., Lehotzky E., Lewis M.A., Whittam T.S., Davies H.D.: Multilocus Sequence Types Associated with Neonatal Group B Streptococcal Sepsis and Meningitis in Canada. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1143–1148 (2009)
58. Margarit I., Grandi G. i wsp.: Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B *Streptococcus* paradigm. *J. Infect. Dis.* **199**, 108–115 (2009)
59. Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K., Wessels M.R.: Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* **60**, 3986–3993 (1992)
60. Martins E.R., Melo-Cristino J., Ramirez M.: Evidence for rare capsular switching in *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* **192**, 1361–1369 (2010)
61. Maruyama R., Fujiwara H.: Synchronous progression of calcium transient-dependent beating and sarcomere destruction in apoptotic adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H1493–1502 (2006)
62. Mavenyengwa R.T., Maeland J.A., Moyo S.R.: Distinctive Features of Surface-Anchored Proteins of Streptococcus agalactiae Strains from Zimbabwe Revealed by PCR and Dot Blotting. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1420–1424 (2008)
63. Mereghetti L., Sitkiewicz I., Green N.M., Musser J.M.: Extensive adaptivebchanges occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) in response to incubation with human blood. *PLoS ONE*, **3**, e3143 (2008)
64. Michel J.L., Madoff L.C., Kling D.E., Kasper D.L., Ausubel F.M.: Cloned α and β C-protein antigens of Group B Streptococci elicit protective immunity. *Infect. Immun.* **59**, 2023–2028 (1991)
65. Miller R.A., Britigan B.E.: Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 1–18 (1997)
66. Morikawa Y., Kitazato M., Katsukawa C., Tamaru A.: Prevalence of cefotaxime resistance in group B *Streptococcus* isolates from Osaka, Japan. *J. Infect. Chemother.* **9**, 131–133 (2003)
67. Nagano N., Nagano Y., Kimura K., Tamai K., Yanagisawa H., Arakawa Y.: Genetic heterogeneity in pbp genes among clinically isolated group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4258–4267 (2008)
68. Nizet V., Gibson R.L., Chi E.Y., Framson P.E., Hulse M., Rubens C.E.: Group B Streptococcal β-hemolysin expression

is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 3818–3826 (1996)
69. Nobbs A.H., Rosini R., Rinaudo C.D., Maione D., Grandi G., Telford J.L.: Sortase A utilizes an ancillary protein anchor for efficient cell wall anchoring of pili in *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* **76**, 3550–3560 (2008)
70. Ozegowski J.H., Presselt N., Härtl A., Bocker T., Sänger J., Schmidt A., Willing K., Müller P.J.: Anti-atherosclerotic effect of microbial hyaluronate lyase from group B streptococci. *Pharmazie*, **63**, 601–605 (2008)
71. Podbielski A., Blankenstein O., Lutticken R.: Molecular characterization of the *cfb* gene encoding Group B Streptococcal CAMP-factor. *Med. Microbiol. Immunol.* (Berl), **183**, 239–256 (1994)
72. Poyart C., Lamy M.C., Boumaila C., Fiedler F., Trieu-Cuot P.: Regulation of D-alanyl-lipotechoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **183**, 6324–6334 (2001)
73. Poyart C., Pellegrini E., Gaillot O., Boumaila C., Baptista M., Trieu-Cuot P.: Contribution of Mn cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* **69**, 5098–5106 (2001)
74. Pritzlaff C.A., Chang J.C., Kuo S.P., Tamura G.S., Rubens C.E., Nizet V.: Genetic basis for the β-haemolytic/ cytolytic activity of Group B *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.* **39**, 236–247 (2001)
75. Puopolo K.M., Madoff L.C.: Upstream short sequence repeats regulate expression of the alpha C protein of group B *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.* **50**, 977–991 (2003)
76. Quach D., van Sorge N.M., Kristian S.A., Bryan J.D., Shelver D.W., Doran K.S.: The CiaR response regulator in Group B Streptococcus promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. *J. Bacteriol.* **191**, 2023–2032 (2008)
77. Rajagopal L., Vo A., Silvestroni A., Rubens C.E.: Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two--component signaling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* **62**, 941–957 (2006)
78. Rinaudo C.D., Rosini R., Galeotti C.L., Berti F., Necchi F., Reguzzi V., Ghezzo C., Telford J.L., Grandi G., Maione D.: Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One*, **15**, e9216 (2010)
79. Ring A., Braun J.S., Nizet V., Stremmel W., Shenep J.L.: Group B Streptococcal β-hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. *J. Infect. Dis.* **182**, 150–157 (2000)
80. Rolland K., Marois C., Siquier V., Cattier B., Quentin, R.: *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1892–1898 (1999)
81. Rosenau A., Martins K., Gannier F., Lanotte P., Ven der Mee--Marquet N., Mereghetti L., Quentin R., Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the fbsA and fbsB genes. *Infect. Immun.* **75**, 1310–1317 (2007)
82. Rosini R., Rinaudo C.D., Soriani M. i wsp. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* **61**, 126–141 (2006)
83. Rozhdestvenskaya A.S., Totolian A.A., Dmitriev A.V.: Inactivation of DNA-binding response regulator Sak189 abrogates beta-antigen expression and affects virulence of *Streptococcus agalactiae*. *PLoS One*, **19**, e10212 (2010)
84. Sadowy E., Matynia B., Hryniewicz W.: Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non--invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1907–1914 (2010)
85. Safadi1 R.A., Amor S., Hery-Arnaud G., Spellerberg B., Lanottel P., Mereghetti1 L., Gannier F., Quentin R., Rosenau1A.: Enhanced Expression of lmb Gene Encoding Laminin- Binding Protein in *Streptococcus agalactiae* Strains Harboring IS 1548in scpB-lmbIntergenic Region. *PLoS ONE*, **5**, e10794 (2010)
86. Samen U., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J., Borges F.: The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **75**, 5405–5414 (2007)
87. Samen U.M., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J.: The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect. Immun.* **74**, 5625–5635 (2006)
88. Samen U., Heinz B., Boisvert H., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J., Borges F.: Rga is a regulator of adherence and pili formation in *Streptococcus agalactiae*. *Microbiol.* Feb 17 (2011). [Epub ahead of print]
89. Santi I., Scarselli M., Mariani M., Pezzicoli A., Masignani V., Taddei A., Grandi G., Telford J.L., Soriani M.: BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to Group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol. Microbiol.* **63**, 754–767 (2007)
90. Santillan, D.A., Andracki M.E., Hunter S.K.: Protective immunization in mice against group B streptococci using encapsulated C5a peptidase. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **198**, e1–e6 (2008)
91. Schubert A., Zakikhany K., Schreiner M., Frank R., Spellerberg B., Eikmanns B. J., Reinscheid D. J.: A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol. Microbiol.* **46**, 557–569 (2002).
92. Seifert K.N., Adderson E.E., Whiting A.A., Bohnsack J.F., Crowley P.J., Brady L.J.: A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (ε) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology*, **152**, 1029–1040 (2006)
93. Shelver D., Rajagopal L., Harris T.O., Rubens C.E.: MtaR, a regulator of methionine transport, is critical for survival of Group B *Streptococcus in vivo*. *J. Bacteriol.* **185**, 6592–6599 (2003)
94. Shelver D., Bryan J. D.: Expression of the *Streptococcus agalactiae* virulence-associated protease CspA in a soluble, active form utilizing the Gram-positive host, *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* **136**, 129–134 (2008)
95. Sorge N.M., Quach D., Gurney1 M.A., Sullam P.M., Nizet V., Doran K.S.: The Group B Streptococcal Srr-1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier. *J. Infect. Dis.* **199**, 1479–1487 (2009)
96. Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S., Weber-Heynemann J., Schnitzler N., Lütticken R., Podbielski A.: Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.* **67**, 871–878 (1999)
97. Spellerberg B., Pohl B., Haase G., Martin S., Weber-Heynemann J., Lutticken R.: Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. *J. Bacteriol.* **181**, 3212–3219 (1999)
98. Spellerberg B., Rozdzinski E., Martin S., Weber-Heynemann J., Lutticken R.: *rgf* encodes a novel twocomponent signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* **70**, 2434– 2440 (2002)
99. Stalhammar-Carlemalm M., Stenberg L., Lindahl G.: Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J. Exp. Med.* **177,** 1593–1603 (1993)
100. Takahashi S., Nagano Y., Nagano N., Hayashi O., Taguchi F., Okuwaki Y.: Role of C5a-ase in Group B Streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infect. Immun.* **63**, 4764–4769 (1995)

101. Takamatsu D., Bensing B.A., Cheng H., Jarvis G.A., Siboo I.R., López J.A., Griffiss J.M., Sullam P.M.: Binding of the *Streptococcus gordonii* surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Ibα. *Mol. Microbiol.* **58**, 380–392 (2005)
102. Tamura G.S., Hull J.R., Oberg M.D., Castner D.G.: High-affinity interaction between fibronectin and the Group B Streptococcal C5a peptidase is unaffected by a naturally occurring four-amino-acid deletion that eliminates peptidase activity. *Infect. Immun.* **74**, 5739–5746 (2006)
103. Tenenbaum T., Spellerberg B., Adam R., Vogel M., Kim K.S., Schroten H.: *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein *Lmb. Microbes Infect.* **9**, 714–720 (2007)
104. Tettelin H., Fraser C.M., i wsp. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial 'pan-genome'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **102**, 13950–13955 (2005)
105. Tettelin H., Fraser C.M., i wsp.: Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **99**, 12391–12396 (2002)
106. Ulrich L.E., Koonin E.V., Zhulin I.B.: One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**, 52–56 (2005)
107. Wästfelt M., Stålhammar-Carlemalm M., Delisse A.M., Cabezon T., Lindahl G.: Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J. Biol. Chem.* **271**, 18892–18897 (1996)
108. Yamamoto Y., Poyart C., Trieu-Cuot P., Lamberet G., Gruss A., Gaudu P.: Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. *Mol. Microbiol.* **56**, 525–534 (2005)
109. Yian Y. Q., Johanson K. O., McDevitt P.: Nuclear magnetic resonance solution structure of truncated human GRO_ [5–73] and its structural comparison with CXC chemokine family members GRO_ and IL-8. *J. Mol. Biol.* **294**, 1065–1072 (1999)
110. Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T.: Penicillin-binding proteins and β-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 361–385 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 53–63
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROSPORYDIA: OPORTUNISTYCZNE PATOGENY LUDZI

Małgorzata Bednarska*[1]

[1] Zakład Parazytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, Warszawa

Wpłynęło w lutym 2012 r.

1. Wstęp. 2. Pozycja systematyczna mikrosporydiów. 3. Charakterystyka spory. 4. Cykl rozwojowy mikrosporydiów. 5. Charakterystyka gatunków wykrywanych u ludzi. 5.1. *Enterocytozoon bieneusi.* 5.2. *Encephalitozoon* spp. 5.3. inne patogenne gatunki. 6. Chorobotwórczość. 7. Epidemiologia. 8. Mikrosporydioza w Polsce. 9. Drogi zarażenia i różnorodność genetyczna. 10. Diagnostyka mikrosporydiozy. 11. Leczenie. 12. Podsumowanie

Microsporidia – opportunistic pathogens of humans

Abstract: Microsporidia are small, unicellular, and obligatory intracellular parasites of vertebrates and invertebrates. Phylogenetic analysis has placed *Microsporidia* with in the *Fungi.* They have very unusual organelles such as single polar tube, polaroplast and anchoring disc. The following genera have been associated with human infections: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon, Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Anncaliia, Vittaforma*, *Brachiola*, *Nosema* and *Microsporidium*. These parasites are etiological agents of diarrhea and disseminated systemic microsporidiosis in immunedeficient or immunecompetent individuals: AIDS patients, organ transplant recipients, travelers, contact lens wearers, children and elderly people. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most common causes of human infections. Microsporidian spores appear to be relatively resistant to environmental conditions, and species of microsporidia infecting humans have been identified in water sources and in free-ranging, domestic or farm animals, with a threat for waterborne, foodborne and zoonotic transmissions. Several methods are available for detection and species differentiation of microsporidia. Microscopy techniques allow the diagnosis of microsporidiosis but for genus and species determination the antigen-based and molecular methods must be used. The most effective drugs for treating microsporidiosis in humans include albendazole and fumagillin. The highly active antiretroviral therapy (HAART) reduces the prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected persons. Future studies shall focus on risk factors predisposing to microsporidiosis.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. The characteristics of spores. 4. The life cycle. 5. Species infecting humans. 5.1. *Enterocytozoon bieneusi.* 5.2. *Encephalitozoon* spp. 5.3. Other pathogenic species. 6. Pathogenicity. 7. Epidemiology. 8. Microsporidiosis in Poland. 9. Transmission routes and genetic diversity. 10. Diagnostic methods. 11. Treatment. 12. Summary

Słowa kluczowe: choroby oportunistyczne, diagnostyka, epidemiologia, leczenie mikrosporydia
Key words: diagnostics, epidemiology, microsporidia, opportunistic diseases, treatment

1. Wstęp

Mikrosporydia są grupą pasożytów, które od ponad 100 lat znajdują się w kręgu zainteresowań parazytologów. Pierwszy odkryty gatunek *Nosema bombycis* opisano w połowie XIX wieku jako przyczynę „choroby pieprzowej", która zdziesiątkowała larwy jedwabników w południowej Europie. Mikrosporydia wywołują wiele chorób o znaczeniu gospodarczym, głównie u ryb i owadów [24, 34]. W chwili obecnej opisano ponad 1200 gatunków występujących u bezkręgowców i kręgowców, a coraz częściej pasożyty te są wykrywane jako patogeny ssaków, w tym ludzi [23, 32, 65, 94].

Pierwsze doniesienie o mikrosporydiach jako przyczynie infekcji u człowieka odnotowano w 1959 roku [55], ale przez następne kilkadziesiąt lat rzadko były one kojarzone z chorobami ludzi [92]. Wzrost zainteresowania tą grupą pasożytów nastąpił wraz z wystąpieniem pandemii AIDS na świecie. W chwili obecnej mikrosporydia są rozpoznawane na całym świecie jako czynnik etiologiczny infekcji oportunistycznych u osób o różnym statusie immunologicznym. Wywołują chroniczne biegunki, oraz rozsiane, wieloukładowe zarażenia nie tylko u chorych z AIDS, ale także u ludzi przyjmujących leki immunosupresyjne, biorców przeszczepów, użytkowników soczewek kontaktowych, podróżnych, dzieci i osób w podeszłym wieku [22, 24, 28, 35, 36, 64, 68, 94].

2. Pozycja systematyczna mikrosporydiów

Mikrosporydia są eukariotycznymi, żyjącymi wewnątrzkomórkowo organizmami należącymi do typu *Microsporidia*, wykazującymi silne pokrewieństwo filogenetyczne z grzybami (*Fungi*) [47, 51, 82, 89, 93]. Ich pozycja systematyczna zmieniała się wraz z rozwojem nauki. W chwili opisania gatunku *Nosema bombycis* przez Balbianiego w 1857 roku uznano go za organizm grzybopodobny i zaklasyfikowano do *Schizomycetes.* W następnych latach mikrosporydia uznano

* Autor korespondencyjny: Zakład Parazytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 55 41 141; e-mail: mabed@biol.uw.edu.pl

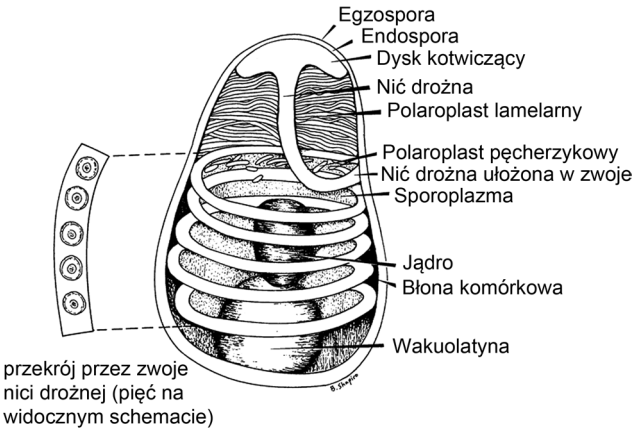
kolejno za pierwotniaki formujące spory – *Sporozoa* (1882), a następnie w obrębie tego taksonu zaliczono do *Cnidosporidia* (1901), podgrupy skupiającej cztery luźno powiązane grupy pasożytów, które charakteryzował wewnątrzkomórkowy tryb życia (*Microsporidia*, *Myxosporidia*, *Actinosporidia* i *Helicosporidia*) [48, 75]. Obecnie są klasyfikowane kolejno jako grzyby, zwierzęta i zielenice. W roku 1982 według nowej hipotezy przyjęto, że mikrosporydia należą do *Archeozoa* – prymitywnych *Eukariota* pozbawionych mitochondriów podobnie jak *Archamoebae* (*Entamoeba*), *Metamonada* (*Giardia*) i *Parabasalia* (*Trichomonas*) [12, 48].

W świetle obecnych badań molekularnych i filogenetycznych uważa się, że mikrosporydia są blisko spokrewnione z grzybami, a o czym świadczą filogenetyczne analizy genów kodujących β-tubulinę, podjednostkę polimerazy RNA II, białko wiążące TATA, oraz czynniki translacyjne EF-1 i EF-2 [46, 47, 51]. Obecność chityny w wewnętrznej otoczce spory także potwierdza przynależność do tej grupy organizmów. W trakcie adaptacji do pasożytniczego trybu życia mikrosporydia rozwinęły wysoce wyspecjalizowany system infekowania komórek żywiciela, ale z drugiej strony utraciły pewne typowe cechy *Eukaryota*: rybosom 80S, mitochondria, peroksysomy i klasyczny aparat Golgiego. Mikrosporydia posiadają rybosom 70S o prokariotycznej budowie z rybosomalnymi podjednostkami (30S i 50S) i cząsteczkami 16S rRNA, 23S rRNA i 5S rRNA, mitosomy oraz atypowy aparat Golgiego [26, 89, 90]. O przynależności mikrosporydiów do *Eukariota* świadczą jednak takie cechy jak obecność białek homologicznych z mitochondrialnymi białkami szoku cieplnego (HSP70) oraz powinowactwo błon polaroplastu do błon aparatu Golgiego. Istnieje również hipoteza zakładająca, że tylna wakuola pełni funkcje peroksysomów [49, 88, 91].

3. Charakterystyka spory

Spora ma unikalną budowę wewnętrzną i jest najbardziej charakterystyczną postacią mikrosporydiów. Jako jedyne stadium rozwojowe ma zdolność do przebywania poza komórką żywiciela, jest postacią dyspersyjną, inwazyjną i diagnostyczną. Jej rozmiary w zależności od gatunku wahają się od jednego do kilkudziesięciu mikrometrów. Błona komórkowa spory otoczona jest przez dwie ściany: zewnętrzną glikoproteinową i wewnętrzną chitynowo-białkową bardzo odporną na działanie czynników środowiska. Struktury wewnętrzne znajdujące się w sporoplazmie są specyficzne i charakterystyczne jedynie dla tego taksonu. Schemat budowy spory przedstawiono na rys. 1 [94].

Drożna nić spełniająca funkcję „strzykawki" przyczepiona jest do szczytu spory swoją rozszerzoną częścią, tzw. dyskiem kotwiczącym, a polaroplast – błoniasta struktura homologiczna z aparatem Golgiego – otacza początkowy, prosty jej fragment. Nić może być nawet 100 razy dłuższa od spory (50–100 µm) i jest charakterystycznie ułożona w zwoje, których liczba (od kilku do ponad 30) i kąt zagięcia stanowią cechę diagnostyczną [96, 98]. W sporoplazmie znajdują się także jedno lub dwa jądra, rybosomy i tylna wakuola prawdopodobnie biorąca udział w gwałtownym wyrzuceniu nici w trakcie inwazji. Gatunki patogenne dla ludzi posiadają spory o niewielkich rozmiarach (1,0–3,0 µm × 1,5–4,0 µm), co znacznie utrudnia ich wykrywanie i rozpoznanie [24, 34, 99].



Rys. 1. Budowa spory mikrosporydium

Rysunek zamieszczony za zgodą Profesora Louisa Weissa z Albert Einstein College of Medicine, USA. Oryginał pochodzi z Wittner M., Weiss L.M. (eds.) The Microsporidia and Microsporidiosis, ASM Press, 1999 (Wittner and Weiss, 1999) ze zmianami.

4. Cykl rozwojowy mikrosporydiów

Do zarażenia dochodzi drogą pokarmową poprzez połkniecie spory, drogą oddechową przez inhalację, drogą płciową (głównie u osób homoseksualnych), poprzez kontakt bezpośredni (śluzówka oka), a także na skutek urazów poprzez otwarte rany. Czynniki pobudzające sporę do dalszego rozwoju są słabo poznane, zależą od środowiskowych warunków fizycznych i chemicznych, takich jak zmiany pH, zmiany wilgotności, obecność specyficznych anionów (bromkowy, chlorkowy, jodkowy, fluorkowy) i kationów (potasowy, sodowy, litu, cezu) oraz niskie dawki promieniowania UV. Czynnikami hamującymi aktywację spor są m.in.: chlorki magnezu i amonu, fluorek sodu, jony srebra, niskie stężenie soli, promieniowanie gamma, wysokie dawki promieniowania UV, temperatura powyżej 40°C, inhibitory kalmoduliny i cytochalazyna D zapobiegająca polimeryzacji aktyny. Gatunek pasożyta odgrywa istotną rolę w dalszym przebiegu inwazji [93].

Gdy aktywacja spory zostanie zaindukowana, pierwszym sygnałem jest wzrost ciśnienia osmotycznego, pęcznienie spory i specyficzne wybrzuszenie polaro-

plastu. Pod wpływem wysokiego ciśnienia spora pęka w najcieńszym miejscu i nić zostaje wystrzelona z prędkością do 100 μm/s, dziurawiąc błonę komórki żywiciela poprzez jej przebicie lub w procesie fagocytozy [33]. Gdy nić jest całkowicie rozwinięta, cytoplazma z zawartością zostaje przepchnięta (wstrzyknięta) do wnętrza komórki w czasie 15–500 ms i dalszy rozwój przebiega odmiennie w zależności od gatunku. Inny mechanizm inwazji oparty jest na fagocytozie spory, która dopiero po dostaniu się do komórki żywicielskiej poprzez rozwiniętą nić infekuje cytoplazmę [33].

W zarażonej komórce tworzą się meronty, które lokalizują się bądź bezpośrednio w cytoplazmie (*Enterocytozoon*, *Nosema*, *Brachiola*), albo otaczają się błoną, która może być pochodzenia pasożytniczego (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*) tworząc tzw. wakuolę parazytoforusa lub pochodzenia żywicielskiego (*Encephalitozoon*) lokalizując się w tzw. sporoforusie [32]. W niektórych przypadkach dochodzi do reorganizacji wnętrza zarażonych komórek i pasożyty mogą zostać otoczone przez różne organelle, np. retikulum endoplazmatyczne, jądro komórkowe bądź mitochondria, lub rozwijać się w ich wnętrzu. Komórki żywiciela pod wpływem pasożyta mogą zostać zdeformowane, zmienić kształt i wielkość. W kolejnym etapie rozwojowym, procesie merogonii, dochodzi do namnażania pasożyta, a następnie w fazie sporogonii formowane są spory, u niektórych gatunków otoczone sporoforusem które infekują kolejne komórki żywiciela lub rozpoczynają fazę pozakomórkową.

5. Charakterystyka gatunków wykrywanych u ludzi

Większość doniesień o mikrosporydiozie jest związana z osobami zarażonymi wirusem HIV, ale mikrosporydia coraz częściej są wykrywane jako objawowe lub bezobjawowe zarażenia u osób o różnym statusie immunologicznym [6, 7, 24, 64, 65]. Gatunki najczęściej wykrywane u człowieka należą do dwóch rodzajów: *Enterocytozoon* z jedynym jak dotąd opisanym przedstawicielem *E. bieneusi* oraz *Encephalitozoon*. W obecnej chwili zagrożenie dla zdrowia człowieka stanowi 15 gatunków należących do 7 rodzajów: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon* (*Septata*), *Pleistophora*, *Trachipleistophora, Brachiola, Vittaforma, Anncaliia* (*Brachiola*) i *Nosema* oraz kilka niesklasyfikowanych tzw. *Microsporidium* [24, 32, 44, 75]. Opisy poszczególnych gatunków zamieszczono w tabeli I.

5.1. *Enterocytozoon bieneusi*

Gatunek *Enterocytozoon bieneusi* po raz pierwszy wykryto w 1985 roku we Francji w enterocytach haitańskiego pacjenta chorego na AIDS [20]. Jest to patogen zazwyczaj wykrywany w przypadkach jelitowej mikrosporydiozy, rzadziej jako przyczyna stanów zapalnych wątroby i woreczka żółciowego [13, 60, 70, 76]. Najczęściej występuje u osób immunologicznie kompetentnych [1, 59, 65]. W przeciwieństwie do innych gatunków mikrosporydiów bardzo rzadko wywołuje zarażenia rozsiane, ograniczając swoją ekspansję do układu oddechowego. *E. bieneusi* jest najmniejszym gatunkiem występującym u ludzi. Owalne spory mają rozmiary 1,1–1,6 μm × 0,7–1,0 μm, a charakterystyczne zwoje nici (5–7) ułożone są dwurzędowo (dwuwarstwowo). W zainfekowanych komórkach, głównie enterocytach, pasożyty rozwijają się w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą [31]. Początkowo był uznawany za gatunek izolowany głównie od ludzi, ale w ciągu następnych lat *E. bieneusi* zaczęto wykrywać także u zwierząt domowych (np. psów i kotów), gospodarskich (np. świń, bydła i drobiu) oraz dziko żyjących (np. bobry, wydry, lisy, króliki) [63, 66, 68, 78, 80].

5.2. *Encephalitozoon* spp.

Wszystkie gatunki należące do tego rodzaju rozwijają się w charakterystycznej wakuoli parazytoforusa. Meronty dzielą się przez podział podłużny i zazwyczaj pozostają w wakuoli. Spory o rozmiarach 2,0–2,5 × 1,0–1,5 μm mają nić polarną ułożoną w 5–7 zwojów, uporządkowanych w jednym rzędzie. Pasożyty, oprócz enterocytów jelita cienkiego i innych komórek nabłonkowych, zasiedlają także fibroblasty, makrofagi oraz komórki śródbłonka [31, 32].

Encephalitozoon intestinalis po raz pierwszy wykryto w 1992 roku u pacjentów zarażonych wirusem HIV [9]. Na podstawie różnic w budowie ultrastruktury został opisany jako *Septata intestinalis*. Dopiero późniejsze badania oparte na analizie sekwencji rDNA potwierdziły przynależność tego gatunku do rodzaju *Encephalitozoon* [40]. Ta reklasyfikacja jest wciąż dyskutowana, gdyż *E. intestinalis* w trakcie swojego rozwoju tworzy unikalną otoczkę (fibrillar network) separującą pasożyta od wakuoli parazytoforusa. Jest to drugi po *E. bieneusi* najczęściej wykrywany gatunek mikrosporydiów u ludzi. Podobnie może być przyczyną biegunek, ale w trakcie rozwijającej się inwazji dosyć często powoduje zapalenie pęcherza moczowego oraz inwazje rozsiane na nerki, płuca, śluzówkę nosa, zatoki oraz oczy i mózg.

Dwa pozostałe gatunki patogenne dla człowieka są morfologicznie nierozróżnialne w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Rozróżnić je można jedynie metodami immunologicznymi, biochemicznymi lub molekularnymi. *Encephalitozoon cuniculi* był pierwszym gatunkiem odkrytym u ssaków. Został wyizolowany od królika w 1922 roku [52] i jest najlepiej poznanym i opisanym gatunkiem spośród wszystkich mikrosporydiów.

Tabela I

Charakterystyka gatunków mikrosporydiów izolowanych od ludzi [10, 24, 25, 32, 43, 54, 79]

Nazwa gatunkowa	Rok wykrycia u człowieka	Lokalizacja	Chorobotwórczość		Żywiciele
			Osoby immuno-kompetnetne	Osoby z niedoborem immunologicznym	
Enterocytozoon bieneusi	1985	układ pokarmowy: jelito cienkie, przewody żółciowe, wątroba, układ oddechowy: śluzówka oskrzeli, tchawicy, nosa	biegunka, zarażenia bezobjawowe	biegunka, stan zapalny jelita, zapalenie dróg żółciowych, pęcherzyka żółciowego, płuc, oskrzeli, zatok, zapalenie śluzowej błony nosa	kręgowce
Encephalitozoon intestinalis (*syn. Septata intestinalis*)	1993	układ pokarmowy: jelito cienkie, przewody żółciowe, układ oddechowy, kości, skóra, zarażenia wieloukładowe	biegunka, zarażenia bezobjawowe	biegunka, owrzodzenie jelita cienkiego, zapalenie dróg żółciowych, pęcherzyka żółciowego, nerek, zakażenie dróg moczowych, zapalenie oskrzeli, zatok, błony śluzowej nosa, zapalenie rogówki	ssaki
Encephalitozoon cuniculi	1923	zarażenia wieloukładowe, układ moczowy, nerki, układ oddechowy, ośrodkowy układ nerwowy, układ pokarmowy, wątroba, śledziona, otrzewna, dwunastnica, oczy, jajnik, serce	ropień mózgu, zapalenie rogówki	zapalenie mózgu, zakażenie pęcherza moczowego, nerek, zapalenie wątroby, otrzewnej, infekcje rozsiane, niewydolność oddechowa, ogólne osłabienie	ssaki
Encephalitozoon hellem	1991	zarażenia wieloukładowe, oczy, układ oddechowy, układ moczowy	zapalenie rogówki	zakażenie dróg moczowych, ropień gruczołu krokowego, zapalenie zatok, błony śluzowej nosa, zapalenie płuc, oskrzeli, nerek, infekcje rozsiane	ptaki
Anncaliia algerae (syn. *Brachiola algerae* syn. *Nosema algerae*)	1999	oczy, mięśnie, struny głosowe	zapalenie rogówki	zapalenie spojówki, rogówki, zapalenie mięśni, zapalenie strun głosowych	owady
*Brachiola connori** (syn. *Nosema connori)*	1959	zarażenia wieloukładowe	bd	infekcje rozsiane, zapalenie mięśni (miositis)	nieznany
Brachiola vesicularum (syn. *Nosema*-like sp.)	1998	mięśnie	bd	zapalenie mięśni	nieznany
Microsporidium ceylonensis	1973	oczy	bd	wrzód rogówki	nieznany
Microsporidium africanum	1981	oczy	bd	wrzód rogówki	nieznany
Nosema ocularum	1991	oczy	bd	zapalenie spojówki i rogówki	nieznany
Pleistophora ronneafiei	1985	mięśnie	bd	zapalenie mięśni	nieznany
Trachipleistophora hominis	1996	mięśnie, oczy, zatoki nosowe	bd	zapalenie mięśni, zapalenie spojówki i rogówki, zapalenie zatok	nieznany
Trachipleistophora anthropophthera	1996	zarażenia wieloukładowe, OUN, oczy	bd	zapalenie mózgu, zapalenie mięśni, infekcje rozsiane	nieznany
Vittaforma corneae (syn. *Nosema corneum*)	1990	oczy, układ moczowy	zapalenie rogówki	zapalenie rogówki	nieznany
Vittaforma- like (96% hom. *V. corneae*)	2003	jelito cienkie, płuca	biegunka	biegunka	nieznany

* Gatunek początkowo opisany jako *Encephalitozoon cuniculi* przez Matsubayashi et al. (1959) później sklasyfikowany jako *Nosema connori* przez Weisera (1993).
bd – brak danych

Pokrewny gatunek *E. hellem* po raz pierwszy wykryto w 1991 roku jako przyczynę rozsianej mikrosporydiozy u trzech pacjentów z AIDS [21]. Do tego momentu wszystkie przypadki zachorowań były diagnozowane mikroskopowo jako inwazje *E. cuniculi*, ale należy przypuszczać, że przypadki encephalitozoonozy u udzi odnotowane przed 1991 rokiem wywoływane były zarówno przez *E. cuniculi*, jak i przez *E. hellem*. Zarażenia tymi dwoma gatunkami rzadko są opisywane jako przyczyna dolegliwości jelitowych, natomiast często wywołują rozsiane infekcje wątroby, nerek, pęcherza moczowego, otrzewnej, tchawicy, oskrzeli, płuc, rogówki i spojówki oraz ośrodkowego układu nerwowego [31].

5.3. Inne gatunki mikrosporydiów

Inne gatunki mikrosporydiów patogenne dla ludzi najczęściej występują u osób z ciężkimi niedoborami odporności. U immunokompetentnych pacjentów związane są zazwyczaj z infekcjami oczu. Mikrosporydia z rodzaju *Nosema* spp. to szeroko rozpowszechnione na całym świecie pasożyty owadów i innych bezkręgowców [86]. W komórkach rozwijają się w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą żywiciela. Stadia wewnątrzkomórkowe są dwujądrowe i tworzą charakterystyczne dla grzybów stadium jąder sprzężonych – dikarion. Spory izolowane od zarażonych ludzi są także niewielkich rozmiarów 4,0–4,5 × 2,0–2,5, a nić biegunowa układa się w 10–12 zwojów [31]. *Nosema ocularum* wywołuje zakażenia rogówki u ludzi, a pozostałe gatunki mogące być przyczyną infekcji oczu to *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora* sp., *Anncalia algerae*, *Microsporidium ceylonensis* oraz *M. africanum* [62, 69, 87]. Gatunek *V. corneae* posiadający podłużne spory o wymiarach 3,7 μm × 1,0 μm i dikariotyczne jadro, był także przyczyną zapalenia dróg moczowych u pacjenta z AIDS, a mikrosporydia sklasyfikowane jako *Vittaforma* – like izolowano od pacjentów z biegunką o różnym statusie immunologicznym [31, 79].

Inwazje wywołane przez mikrosporydia z rodzaju *Pleistophora* i *Trachipleistophora* powodują zapalenie mięśni objawiające się gorączką, mięśniobólami, nadwrażliwością mięśni i ogólnym osłabieniem organizmu. Gatunek *T. hominis* opisano jako przyczynę zapalenia mięśni u 4 chorych na AIDS [30]. Pokrewny gatunek *T. anthropophthera* był izolowany od pacjentów z zaburzeniami nerwowymi i z objawami podobnymi do neurotoksoplazmozy. W trakcie autopsji spory *Trachipleistophora* izolowano także z serca, tarczycy, trzustki, wątroby, śledziony, szpiku kostnego i węzłów limfatycznych [99]. Zarażenie *Anncaliia algerae*, oprócz zapalenia rogówki i zapalenia mięśni, może być przyczyną zapalenia tkanki łącznej lub strun głosowych (Tab. I) [10].

6. Chorobotwórczość mikrosporydiów

Kliniczne objawy mikrosporydiozy zależą od statusu immunologicznego zarażonej osoby, a także od miejsca inwazji oraz od gatunku pasożyta. U osób immunologicznie kompetentnych dochodzi do zarażenia dwoma najczęściej spotykanymi gatunkami *E. bieneusi* i *E. intestinalis.* Rozwija się zazwyczaj postać jelitowa z biegunką lub innymi dolegliwościami ustępującymi po ok. 2 tygodniach lub inwazja może przejść w fazę chroniczną albo pozostać bezobjawowa. U osób immunokompetentnych także rogówka oka jest miejscem uprzywilejowanym do powstawania infekcji ocznych wywoływanych przez mikrosporydia, które powodują nieostrość widzenia oraz stany zapalne i owrzodzenia rogówki. Zarażeniom oczu sprzyja używanie soczewek kontaktowych oraz stosowanie terapii sterydowej [69].

U osób z niedoborami odporności przebieg mikrosporydiozy jest dużo cięższy. Pacjenci z zespołem AIDS lub z innymi niedoborami odporności, o liczbie limfocytów CD4+ poniżej 100/μl, zarażeni *E. bieneusi* lub *E. intestinalis*, często zapadają na wodnistą biegunkę połączoną z gorączką, utratą wagi i wyniszczeniem organizmu. Także pacjenci z ciężkimi chorobami (reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, białaczka) są narażeni na wielonarządowe infekcje wywołane przez gatunki z rodzaju *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora, Vittaforma*, *Anncaliia (Brachiola)* i *Nosema*. W przypadku osób z grup ryzyka infekcje częściej mają ostry przebieg i mogą być przyczyną śmierci [11, 54, 83].

7. Epidemiologia

Mikrosporydioza występuje u ludzi na całym świecie, lecz częstości wykrywanych zarażeń różni się w zależności od regionu geograficznego i od stosowanych metod diagnostycznych. Przed falą zachorowań na AIDS rzadko była identyfikowana jako choroba człowieka, a po 1985 roku badania dotyczyły głównie osób zarażonych wirusem HIV, u których ekstensywność występowania mikrosporydiów waha się od 5 do 50% w zależności od położenia geograficznego i stosowanych metod badawczych. Najczęściej mikrosporydioza u chorych na AIDS występuje w południowej Azji (Indie, Tajlandia), Afryce (Tunezja, Mali, Uganda, Senegal, Zimbabwe) i Południowej Ameryce (Brazylia, Peru). U tej grupy pacjentów zarażenia są często wykrywane w koinwazji z *Cryptosporidium* [8, 28, 29, 67, 74, 76]. Serologiczne badania epidemiologiczne z ostatniej dekady wykazały obecność przeciwciał u osób immunokompetentnych, m.in. dawców krwi, pracowników leśnych, właścicieli zwierząt i ciężarnych kobiet (1,3–22%) [64]. U podróżnych (3,3–10%) oraz dzieci i osób starszych

mikrosporydia wykrywane są jako czynnik etiologiczny biegunek (6–17%) [53, 59 84, 85, 95], a pozostałe grupy ryzyka stanowią osoby noszące soczewki kontaktowe oraz pacjenci po przeszczepach stosujący leki supresyjne (kilkadziesiąt udokumentowanych przypadków) [16, 23, 36, 50, 69, 81]. Coraz częściej bezobjawowe zarażenia mikrosporydiami stwierdzane są u osób immunokompetentnych (42%–67%) [64, 65, 77].

8. Mikrosporydioza w Polsce

W Polsce brak jest informacji o występowaniu mikrosporydiozy u ludzi i zwierząt w przeciwieństwie do innych wywołujących biegunki pasożytów jelitowych z rodzaju *Cryptosporidium* i *Giardia* [4, 97]. W czasie badań prowadzonych w naszym zakładzie wśród pacjentów z grup ryzyka (osoby przed/po przeszczepach przyjmujący leki immunosupresyjne, osoby z wrodzonymi niedoborami odporności, chorzy na inne choroby) wykazano 10 przypadków zarażenia mikrosporydiami w rozmazach kałowych barwionych trichromem i/lub techniką PCR [5, 6]. Analiza molekularna badanych izolatów pozwoliła potwierdzić u jednej z pacjentek zarażenie *E. bieneusi* (sekwencja zdeponowana w GenBank, nr akcesyjny JN107808) [6].

W innych badaniach przeprowadzonych przez S ł o d k o w i c z i wsp. [73] stwierdzono trzy przypadki zarażeń mikrosporydiami u hemodializowanych pacjentów (10%). Wykorzystując technikę FISH w dwóch przypadkach potwierdzono inwazję *E. cuniculi*, natomiast u trzeciego pacjenta jednoczesne zarażenie *E. cuniculi* i *E. intestinalis.* Ponadto spory *E. bieneusi* wykryto w próbach kałowych ssaków żyjących w poznańskim ogrodzie zoologicznym, a spory *E. hellem* u kilku gatunków dziko żyjących ptaków wodnych i ptaków znajdujących się w poznańskim ZOO. U gęsi domowej (*Anser anser domestica*) stwierdzono obecność spor *E. intestinalis* [71, 72]. Świeże produkty spożywcze także mogą być źródłem patogennych mikrosporydiów w naszym kraju. Spory *Enterocytozoon* i *Encephalitozoon* wykryto na świeżych owocach, kiełkach i zielonych liściach warzyw [43].

9. Drogi zarażenia i różnorodność genetyczna mikrosporydiów

Drogi transmisji mikrosporydiów nie są dokładnie poznane, ale udowodniono że źródłami zakażeń mogą być woda i żywność. Spory są obecne w wodzie, są także odporne na szeroki zakres temperatur, co sprzyja ich przeżywaniu w środowisku zewnętrznym. Małe rozmiary oraz nieduża dawka potrzebna do zarażenia także mają wpływ na rozwój inwazji. Kilka gatunków mikrosporydiów niebezpiecznych dla ludzi (*E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *V. corneae*) izolowano z wodociągów komunalnych, rowów melioracyjnych, ścieków, wód powierzchniowych i podziemnych [27, 42]. Wykazano także, iż mikrosporydia były jednym z czynników etiologicznych epidemii wodno-pochodnej we Francji [15]. Agencja Ochrony Środowiska USA (US Environmental Protection Agency) dwukrotnie umieszczała gatunki najczęściej zarażające ludzi (*E. bieneusi* i *E. intestinalis*) na liście niebezpiecznych czynników (listy CCL-1 i CCL-2), mogących skazić wodę, jako patogeny wymagające monitorowania (Drinking Water Contaminant Candidate List) (http://www.epa.gov/safewater/ccl/cclfs.html). Podobnie National Institutes of Health i Center for Disease Control and Prevention (CDC) zakwalifikowały mikrosporydia do kategorii B, jako czynniki mogące wywołać epidemie wodnopochodne.

Do zarażenia dochodzi najczęściej drogą pokarmową i inhalacyjną, a obecność spor w kale i moczu może wskazywać, że transmisja horyzontalna może przebiegać na drodze fekalno-oralnej lub oralno-oralnej poprzez spożycie zanieczyszczonego pokarmu lub wody, bądź też przez wdychanie skażonego powietrza lub poprzez śluzówkę oka [69, 92]. Także u osób homoseksualnych wrasta ryzyko zarażeń mikrosporydiami [7]. Pierwszą związaną z żywnością (foodborne) epidemię mikrosporydiozy odnotowano w 2009 roku, w której źródłem zarażenia były sałata i ogórki [18]. Kąpiel w basenach i gorących źródłach może być także źródłem mikrosporydiozy [41].

W ciągu ostatnich kilku lat rozwój technik biologii molekularnej pozwolił wykazać, że mikrosporydioza u ludzi może mieć podłoże zoonotyczne. Największy rezerwuar zoonotyczny posiada gatunek *E. bieneusi,* którego spory wykrywano m.in. u makaków, małp wąskonosych marmozetów, świń, bydła, koni, lam, antylop kudusów, psów, kotów, lisów, szopów, wydr, świnek morskich, bobrów, królików, piżmaków, sokołów i innych ptaków [45, 63, 66, 68, 78, 80]. Badania oparte na różnicach w obrębie regionu ITS wykazały dużą różnorodność genetyczną. Dotychczas opisano 94 genotypy występujące tylko u ludzi, 11 wspólnych dla ludzi i kilku gatunków zwierząt oraz pozostałe kilkadziesiąt, charakterystyczne wyłącznie dla zwierząt [19, 78].

Także w obrębie gatunku *E. cuniculi*, opisanego pierwotnie jako gatunek zoonotyczny, wyróżnia się obecnie trzy szczepy o różnicach fenotypowych i genotypowych opartych na różnej liczbie powtórek fragmentu złożonego z 4 nukleotydów (5'-GTTT-3') w obrębie regionu ITS. Szczep I (rabbit strain) *E. cuniculi* był izolowany od królików i od ludzi, szczep II (mouse strain) występuje u myszy i lisów błękitnych, a szczep III (dog strain) był izolowany od psów i ludzi [58]. Wszystkie trzy szczepy były izolowane od ptaków [45].

Różnice genetyczne w obrębie gatunku *E. hellem* wynikają z polimorfizmu regionu ITS i genów kodu-

jących białka nici polarnej (polar tube protein PTP). W chwili obecnej opisanych jest 5 różnych genotypów (1A, 1C, 1D, 2B, 2C) izolowanych od ptaków i ludzi.

Potwierdzono także możliwość bezpośredniej, zoonotycznej transmisji mikrosporydiów. Opisano dwa takie przypadki zarażenia wywołane gatunkiem *E. cuniculi.* U dziesięcioletniej dziewczynki stwierdzono serokonwersję po kontakcie z zainfekowanymi psami [56] oraz infekcję i stan zapalny rogówki u chłopca, który doznał urazu oka po ubodzeniu przez kozę [3]. W przypadku gatunku *Anncaliia algerae*, mikrosporydiów naturalnie pasożytujących w komarach i innych owadach, istnieje ryzyko transmisji poprzez wektor. U pacjentów zakażonych wirusem HIV ukąszenia przez pszczoły, osy czy szerszenie uznaje się za czynnik ryzyka wystąpienia mikrosporydiozy. Także szczególnie osobom z obniżoną odpornością zaleca się picie przegotowanej lub butelkowanej wody i podawanie obróbce termicznej spożywanych mięs, ryb i owoców morza [23].

10. Diagnostyka mikrosporydiozy

Ze względu na niewielkie rozmiary mikrosporydia są trudne do wykrycia w próbach medycznych czy środowiskowych. Początkowo identyfikacja pasożytów opierała się na badaniu ich ultrastruktury przy użyciu mikroskopu elektronowego. Dzięki tej technice dokładnie poznano stadia rozwojowe mikrosporydiów oraz znaczące różnice w budowie poszczególnych gatunków. Do badań na szeroką skalę mikroskop elektronowy nie jest przydatny ze względu na wysokie koszty, czasochłonność i potrzebę posiadania wyspecjalizowanego personelu.

Rutynowo do wykrywania mikrosporydiów wykorzystywany jest mikroskop świetlny. W ostatniej dekadzie nastąpił rozwój różnych technik barwienia, a jedną z bardziej specyficznych jest zmodyfikowana metoda barwienia chromotropem 2R według metody Webera [92]. Spory barwią się na opalizujący, różowy kolor. Często także stosowane jest barwienie fluorescencyjne przy użyciu takich barwników jak calcofluor, fungifluor czy Uvitex B. Optyczne barwniki wiążą się z chityną w ścianie spory i świecą w mikroskopie fluorescencyjnym na kolor biały lub turkusowy. Niestety, barwniki te mają także powinowactwo do innych grzybów, co może utrudniać diagnostykę różnicową mikrosporydiów. Wymienione techniki najczęściej stosuje się do barwienia rozmazów kałowych i płynów ustrojowych, ale użyteczne są też, obok hematoksyliny i eozyny, w barwieniu skrawków parafinowych [31, 37].

Do identyfikacji gatunków i genotypów mikrosporydiów stosowane są wysoko specyficzne i czułe metody molekularne: PCR, nested-PCR, real time PCR [27, 57, 61]. Kwas nukleinowy DNA pasożytów może być izolowany z różnorodnego materiału: kału, moczu, treści dwunastniczej, żółci, wydzieliny płuc, bioptatów tkanek czy zeskrobiny rogówki. Techniki molekularne są także przydatne do identyfikacji nowych gatunków i genotypów izolowanych od ludzi i zwierząt [31, 38]. Izolacja DNA mikrosporydiów wymaga wstępnego etapu zniszczenia ściany spory. Stosuje się wysokie temperatury (gotowanie), trawienie proteinazą K lub enzymami rozpuszczającymi chitynę (chitynaza, litykaza), mechanicznie przez rozbijanie szklanymi kulkami lub wykorzystuje się zestawy komercyjne. W przypadku badania prób kałowych zalecane jest stosowanie 0,5 % podchloryn sodu, 10% formaliny lub 1 M KOH w celu usunięcia inhibitorów PCR [31, 32, 59].

Markerami genetycznymi najczęściej stosowanymi w badaniach mikrosporydiów są geny rRNA: gen małej podjednostki rybosomu (SSU rRNA), gen dużej podjednostki rybosomu (LSU rRNA) oraz region ITS, który charakteryzuje się dużą zmiennością genotypową w obrębie gatunków, co pozwala na różnicowanie szczepów/ gengatunków. Inną grupą markerów stosowanych w diagnostyce mikrosporydiów jest rodzina silnie konserwowanych genów α- , β- i γ-tubuliny, które z powodzeniem mogą być stosowane w badaniach ewolucyjnych [31, 38].

Metody immunologiczne takie jak immunofluorescencja (IFA), ELISA, western blot, są również stosowane w diagnostyce mikrosporydiów [27]. Wykorzystuje się szereg monoklonalnych i poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom ściany spory lub białkom nici polarnej gatunków najczęściej zarażających ludzi. Testy IFA są mniej czułe niż PCR, a ich specyficzność i wrażliwość zależą w dużym stopniu od stosowanych przeciwciał. Do wykrywania i identyfikacji mikrosporydiów stosuje się także metodę FISH (fluorescent *in situ* hybridization), opartą na wykorzystaniu sond wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi, które wiążą się z kwasami nukleinowymi (DNA lub RNA) mikrosporydiów. Metoda ta może być z powodzeniem stosowana w badaniu świeżego materiału, przechowywanego w formalinie lub w formie skrawków parafinowych, lecz jest bardzo pracochłonna i mniej czuła niż PCR. Jest jednak szczególnie przydatna w badaniach środowiskowych do różnicowania „żywych" spor (inwazyjnych) i oceny stopnia zagrożenia epidemiologicznego. Rutynowa diagnostyka mikrosporydiów powinna być oparta na zastosowaniu dwóch różnych metod: histologicznej i molekularnej, bądź immunologicznej ze względu na brak jednej referencyjnej techniki.

11. Leczenie

W leczeniu mikrosporydiozy stosuje się szereg leków, których wybór jest uzależniony od gatunku pasożyta, zainfekowanych narządów oraz przebiegu choroby. Do

terapii najczęściej występujących zarażeń jelitowych stosowane są leki zawierające albendazol i fumagilin [17, 39].

Albendazol jest pochodną benzimidazolu, która hamuje polimeryzację β-tubuliny. Ma szerokie spektrum działania przeciwko pasożytniczym helmintom i grzybom. Albendazol najskuteczniej działa na zarażenia wywołane przez *Encephalitozoon* spp. W przypadku inwazji *E. bieneusi*, w mniejszym stopniu powoduje zahamowanie rozmnażania i spadek liczby pasożytów [2, 17, 39].

Fumagilin, antybiotyk wyodrębniony z grzyba *Aspergillus fumigatus*, działa na enzym niezbędny w metabolizmie komórkowym mikrosporydiów – metioninę aminopeptydazy typu II [3, 14, 23, 24]. Lek jest wysoce skuteczny w leczeniu zarażeń *E. bieneusi*, lecz u niektórych pacjentów może wywoływać neutropenię i trombocytopenię [2, 17]. Półsyntetyczna pochodna fumagilinu TNP-470 (AGM-1470) jest także skuteczna w leczeniu, ale ma mniej działań niepożądanych dla pacjenta. Fumagilin jest również stosowany miejscowo do leczenia zarażeń rogówki wywołanych przez *Encephalitozoon* spp. i *V. cornea* [68].

Oprócz wyżej wymienionych leków w leczeniu rozsianej mikrosporydiozy, w zależności od przebiegu choroby, stosuje się także: metronidazol, atowakwon, nifedipin, azytromycynę, furazolidon, itrakonazol, nitazoxanide, ocreotide, sinefungin i leki sulfonamidowe [2, 24, 17, 39].

U osób zarażonych wirusem HIV pomocne jest stosowanie wysoko skutecznej terapii antyretrowirusowej HAART (highly active antiretroviral therapy). Obniża ona wirulencję wirusa, jednocześnie powodując wzrost liczby limfocytów T CD4+. W konsekwencji dochodzi do zmniejszenia częstości występowania wielu zakażeń oportunistycznych, w tym mikrosporydiozy [11, 17, 38].

12. Podsumowanie

Na świecie wzrasta liczba zachorowań na mikrosporydiozę u osób o różnym statusie immunologicznym, zwiększa się także liczba gatunków zdolnych do wywołania inwazji u człowieka. Jak dotąd słabo są poznane drogi zarażenia tą grupą patogenów, choć przyjmuje się, że woda stanowi najczęstsze źródło pasożytów. Dodatkowo diagnostyka mikrosporydiów i leczenie zarażeń, szczególnie wieloukładowych, może stwarzać duże problemy nawet dla specjalistów. Przyczyniają się do tego niewielkie rozmiary mikrosporydiów, niespecyficzne objawy chorobowe oraz brak szeroko dostępnych testów diagnostycznych. Zdobywanie nowej wiedzy o mikrosporydiach, szczególnie w zakresie danych epidemiologicznych i środowiskowych, pozwoli lepiej kontrolować skażenie środowiska sporami i wpłynie na poszerzenie wiedzy o tych mikroorganizmach.

Piśmiennictwo

1. Abreu-Acosta N., Lorenzo-Morales J., Leal-Guio Y., Coronado--Alvarez N., Foronda P., Alcoba-Florez J., Izquierdo F., Batista--Díaz N., Del Aguila C., Valladares B.: *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99,** 848–55 (2005)
2. Anane S., Attouchi H., Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **34**, 450–464 (2010)
3. Ashton N., Wirasinha P.A.: Encephalitozoonosis (nosematosis) of the cornea. *Br. J. Ophthalmol.* **57**, 669–674 (1973)
4. Bajer A., Bednarska M., Siński E.: *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.- environmental studies in Poland. *Wiad. Parazytol.* **55**, 301–304 (2009) [Article in Polish]
5. Bednarska M., Bajer A., Graczyk T.K., Siński E.: Opportunistic parasites in immunocompetent and immunodeficient patients with diarrhea. Pro. 3rd Int. Giardia and Cryptosporidium Conf. 2009 Oct 11–15, Orvieto, Italy. Local Organising Committee, Istituto Superiore di Sanita, Rome; Abstract P109 (2009)
6. Bednarska M., Bajer A., Welc-Falęciak R., Samoliński B., Wolska-Kuśnierz B., Jankowska I., Graczyk T., Siński E.: Występowanie mikrosporydiów jelitowych u pacjentów z obniżoną odpornością. 50 Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej, Łódź, 2011.
7. Bergquist R., Morfeldt-Mansson L., Pehrson P.O., Petrini B., Wasserman J.: Antibody against *Encephalitozoon cuniculi* in Swedish homosexual men. *Scand. J. Infect. Dis.* **16**, 389–391 (1984)
8. Brasil P., de Lima D.B., de Paiva D.D., Lobo M.S., Sodré F.C., Silva S.P., Villela E.V., Silva E.J., Peralta J.M., Morgado M., Moura H.: Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **42**, 299–304 (2000)
9. Cali A., Kotler D.P., Orenstein J.M.: *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 101–112 (1993)
10. Cali A., Neafie R., Weiss L.M., Ghosh K., Vergara R.B., Gupta R., Takvorian P.M.: Human vocal cord infection with the Microsporidium *Anncaliia algerae*. *Eukaryot. Microbiol.* **57**, 562–567 (2010)
11. Carr A., Marriott D., Field A.,Vasak E., Cooper D.A.: Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet*, **351**, 256–261 (1998)
12. Cavalier-Smith T.: A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* **73**, 203–266 (1998)
13. Chabchoub N., Abdelmalek R., Mellouli F., Kanoun F., Thellier M., Bouratbine A., Aoun K.: Genetic identification of intestinal microsporidia species in immunocompromised patients in Tunisia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 24–27 (2009)
14. Champion L., Durrbach A., Lang P., Delahousse M., Chauvet C., Sarfati C., Glotz D., Molina J.M.: Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **10**, 1925–1930 (2010)
15. Cotte L., Rabodonirina M., Chapuis F., Bailly F., Bissuel F., Raynal C., Gelas P., Persat F., Piens M.A., Trepo C.: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **180**, 2003–2008 (1999)
16. Cotte L., Rabodonirina M.L., Radenne S., Besada E., Trepo C.: Microsporidiosis and Transplantation: a retrospective study of 23 cases. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50** (Suppl), 583 (2003)

17. Conteas C.N., Berlin O.G., Ash L.R., Pruthi J.S.: Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **63**, 121–127 (2000)
18. Decraene V., Lebbad M., Botero-Kleiven S., Gustavsson A.M., Löfdahl M.: First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol. Infect*. **140**, 519–527 (2012)
19. Dengjel B., Zahler M., Hermanns W., Heinritzi K., Spillmann T., Thomschke A., Löscher T., Gothe R., Rinder H.: Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4495–4499 (2001)
20. Desportes I., le Charpentier Y., Galian, A., Bernard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P., Modigliani R.: Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g.,n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool*. **32**, 250–254 (1985)
21. Didier E.S., J.A., Shadduck i wsp.: Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n.sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **163**, 617–621 (1991)
22. Didier E.: Microsporidiosis and HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. **24**, 290–292 (2000)
23. Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K., Didier P.J.: Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol*. **126,** 145–166 (2004)
24. Didier E.S.: Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals *Acta Tropica*, **94**, 61–76 (2005)
25. Ditrich O., Chrdle A., Sak B., Chmelík V., Kubále J., Dyková I., Kvác M.: *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2769–2771 (2011)
26. Dong S., Shen Z., Xu L., Zhu F.: Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of five microsporidia. *Curr. Microbiol.* **60**, 30–37 (2010)
27. Dowd S.E., Gerba C.P., Kamper M., Pepper I.L.: Evaluation of methodologies including immunofluorescent assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of human pathogenic microsporidia in water. *J. Microbiol. Methods,* **35**, 43–52 (1999)
28. Dworkin M.S., T.R. Navin i wsp.: Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in major united states cities. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **49**, 339–342 (2007)
29. Espern A., F. Gay-Andrieu i wsp.: Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J. Clin. Microbiol*. **45**, 2999–3002 (2007)
30. Field A.S., Marriott D.J., Milliken S.T., Brew B.J., Canning E.U., Kench J.G., Darveniza P., Harkness J.L.: Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol*. **34**, 2803–2811 (1996)
31. Franzen C., Müller A.: Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev*. **12**, 243–285 (1999)
32. Franzen C., Müller A.: Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* **3**, 389–400 (2001)
33. Franzen C.: Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol.* **20**, 275–279 (2004)
34. Franzen C.: Microsporidia: a review of 150 years of research. *Open Parasitol. J.* **2**, 1–34 (2008)
35. Galvan A.L., Martín Sanchez A.M., Perez Valentín M.A., Henriques-Gil N., Izquierdo F., Fenoy S., del Aguila C.: First cases of microsporidiosis in transplant ecipients in Spain and review of the literature *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1301–1306 (2011)
36. Garcia LS.: Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol*. **40**, 1892–1901 (2002)
37. Ghosh K., Weiss L.M.: Molecular diagnostic tests for microsporidia *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009: Doi :10.1155/2009/926521.
38. Goguel J., Katlama C., Sarfati C., Maslo C., Leport C., Molina J.M.: Remission of AIDS-associated intestinal microsporidiosis with highly active antiretroviral therapy. *AIDS,* **11**, 1658–1659 (1997)
39. Gross U.: Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol. Res*. **90** (Suppl. 1), S14–S18 (2003)
40. Hartskeerl R.A., Van Gool T., Schuitema A.R., Didier E.S., Terpstra W.J.: Genetic and immunological characterization ofthe microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*, **110**, 277–285 (1995)
41. Hutin Y.J., Sombardier M.N., Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Modaï J., Molina J.M.: Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis*. 178, 904–907 (1998)
42. Hoffman R.M., Wolk D.M., Spencer S.K., Borchardt M.A.: Development of a method for the detection of waterborne microsporidia. *J. Microbiol. Methods,* **70**, 312–318 (2007)
43. Jędrzejewski S., Graczyk T.K., Słodkowicz-Kowalska A., Tamang L., Majewska A.C.: Quantitative Assessment of Contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4071–4073 (2007)
44. Kaneshiro E.S., Cushion M.T., Marciano-Cabral F., Weiss L.M., Xiao L.: Highlights and summaries of the 11th International Workshops on Opportunistic Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **58**, 1–6 (2011)
45. Kasicková D., Sak B., Kvác M., Ditrich O.: Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet. Parasitol.* **165**, 125–130 (2009)
46. Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D.: Evidence from beta tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 23–31 (2000)
47. Keeling P.J., Fast N.M.: Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 93–116 (2002)
48. Keeling P.: Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathog*, 5(9): e1000489. doi:10.1371/journal.ppat.1000489 (2009)
49. Keeling P.J, Corradi N.: Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence,* **2**, 67–70 (2011)
50. Lanternier F., Lortholary O. i wsp.: Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transpl. Infect. Dis.* **11**, 83–88 (2009)
51. Lee S.C., Corradi N., Byrnes E.J. 3rd, Torres-Martinez S., Dietrich F.S., Keeling P.J., Heitman J.: Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.* **18**, 1675–1679 (2008)
52. Levaditi C., Nicolau S., Schoen R.: L'agent 'etiologique de l'enc' ephalite' epizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C.R. Acad. Sci. Biol.* **89**, 984–986. (1923)
53. Lores B., Lopez-Miragaya I., Arias, C., Fenoy S., Torres, J., del Aguila C.: Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 918–921 (2002)
54. Mathis A., Weber R., Deplazes P.: Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev*. **18**, 423–45 (2005)

55. Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiware S.: A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *A.M.A. Arch. Pathol.* **67**, 181–187 (1959)
56. McInnes E.F., Stewart C.G.: The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **62**, 51–54 (1991)
57. Menotti J., Cassinat B., Porcher R., Sarfati C., Derouin F., Molina J.M.: Development of a real-time polymerase-chain--reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *J. Infect. Dis.* **187**, 1469–1474 (2003)
58. Metenier G., Vivares Ch.P.: Molecular characteristics and physiology of microsporidia *Microbes Infect.* **3**, 407–441 (2001)
59. Müller A., Bialek R., Kämper A., Fätkenheuer G., Salzberger B., Franzen C.: Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1630–1632 (2001)
60. Nkinin S.W., Asonganyi T., Didier E.S., Kaneshiro E.S.: Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2841–2846 (2007)
61. Notermans D.W., Peek R., de Jong M.D., Wentink-Bonnema E.M., Boom R., van Gool T.: Detection and identification of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* species in stool and urine specimens by PCR and differential hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 610–614 (2005)
62. Pinnolis M., Egbert P.R., Font R.L., Winter F.C.: Nosematosis of the cornea. Case report, including electron microscopic studies. *Arch. Ophthalmol.* **99**, 1044–1047 (1981)
63. Sak B., Kvác M., Hanzlíková D., Cama V.: First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* **153**, 220–224 (2008)
64. Sak B., Kucerova Z., Kvac M., Kvetonova D., Rost M., Secor E.W.: Seropositivity for *Enterocytozoon bieneusi*, Czech Republic. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 335–337 (2010)
65. Sak B., Brady D., Pelikánová M., Květoňová D., Rost M., Kostka M., Tolarová V., Hůzová Z., Kváč M.: Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1064–1070 (2011)
66. Sak B., Kváč M., Květoňová D., Albrecht T., Piálek J.: The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M.m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Vet. Parasitol.* **178**, 246–250 (2011)
67. Samie A., Obi C.L., Tzipori S., Weiss L.M., Guerrant R.L.: Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**, 547–554 (2007)
68. Santín M., Fayer R.: Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci.* **90**, 363–371 (2011)
69. Sharma S., Das S., Joseph J., Vemuganti G.K., Murthy S.: Microsporidial keratitis: need for increased awareness. *Surv. Ophthalmol.* **56**, 1–22 (2011)
70. Sheikh R.A., Prindiville T.P., Yenamandra S., Munn R..J, Ruebner B.H.: Microsporidial AIDS cholangiopathy due to *Encephalitozoon intestinalis*: case report and review. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 2364–2371 (2000)
71. Słodkowicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jędrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C.: Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4540–4544 (2006)
72. Słodkowicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Girouard A.S.: Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitol Res.* **100**, 505–509 (2007)
73. Słodkowicz-Kowalska A., Zaremba-Drobnik D., Czekalski S., Majewska A.C.: Occurrence of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. cuniculi* of haemodialysis patients [in Polish]. Proceedings of the 22nd Polish Parasitological Society; 2010 Sep 1–3; Puławy, Poland. National Veterinary Research Institute; PIWet-PIB; Abstract U4–3; (2010)
74. Sokolova O.I., Demyanov A.V., Bowers L.C., Didier E.S., Yakovlev A.V., Skarlato S.O., Sokolova Y.Y.: Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **49**; 2102–2108 (2011)
75. Sprague V., Becnel J.J., Hazard E.I.: Taxonomy of phylum microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 285–395 (1992)
76. Stark D., van Hal S., Barratt J., Ellis J., Marriott D., Harkness J.: Limited genetic diversity among genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from HIV-infected patients from Sydney, Australia *J. Med. Microbiol.* **58**, 355–357 (2009)
77. Nkinin S.W., Asonganyi T., Didier E.S., Kaneshiro E.S.: Microsporidian infection is prevalent in healthy people in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2841–2846 (2007)
78. Sulaiman I.M., Fayer R., Yang C., Santin M., Matos O., Xiao L.: Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol. Res.* **92**, 328–334 (2004)
79. Sulaiman I.M., Matos O., Lobo M.L., Xiao L.: Identification of a new microsporidian parasite related to *Vittaforma corneae* in HIV-positive and HIV-negative patients from Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50** (Suppl) 586–590 (2003)
80. Sulaiman I.M., Fayer R., Lal A.A., Trout J.M., Schaefer F.W. 3rd, Xiao L.: Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi. Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4495–4501 (2003)
81. Teachey D.T., Russo P., Orenstein J.M., Didier E.S., Bowers C., Bunin N.: Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation *Bone Marrow Transplant.* **33**, 299–302 (2004)
82. Thomarat F., Vivares C.P., Gouy M.: Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J. Mol. Evol.* **59**, 780–791 (2004)
83. Tuli L., Gulati A.K., Sundar S., Mohapatra T.M.: Correlation between CD4 counts of HIV patients and enteric protozoan in different seasons – an experience of a tertiary care hospital in Varanasi (India). *BMC Gastroenterol.* **20**, 8:36 (2008)
84. Tumwine J.K., Kekitiinwa A., Nabukeera N., Akiyoshi D.E., Buckholt M.A., Tzipori S.: *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**, 299–303 (2002)
85. Valperga S.M., de Jogna Prat S.A., de Valperga G.J., Lazarte S.G., de Trejo A.V., Diaz N., Huttman H.M.: Microsporidian spores in the stool specimens of toddlers, with or without diarrhea, from Tucuman. Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **31**, 157–164 (1999)
86. Vavra J., Undeen A.H.: *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi Liston* (Diptera, Culicidae). *J. Protozool.* **17**, 240–249 (1970)
87. Vavra J., Yachnis A.T., Shadduck J.A., Orenstein J.M.: Microsporidia of the genus Trachipleistophora—causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: Microsporidia). *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 273–283 (1998)

88. Vivares C.P., Gouy M., Thoarat F., Metenier G.: Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 499–505 (2002)
89. Vossbrinck C.R., Woese C.R.: Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature,* **320**, 287–288 (1986)
90. Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B.A., Woese C.R.: Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature,* **326**, 411–414 (1987)
91. Vossbrinck C.R., Debrunner-Vossbrink B.A.: Molecular phylogeny of the microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol.* (Praha), **52**, 131–142 (2005)
92. Weber R., Bryan, R.T., Schwartz D.A., Owen R.L.: Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 426–461 (1994)
93. Weiss L.M., Edlind T.D., Vossbrinck C.R., Hashimoto T.: Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 17S–18S (1999)
94. Weiss L.M.: Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop*. **78**, 89–102 (2001)
95. Wichro E., Hoelzl D., Krause R., Bertha G., Reinthaler F., Wenisch C.: Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 285–287 (2005)
96. Wittner M.: Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. (w) Wittner M., Weiss L.M. (Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 1999, str. 1–6.
97. Wolska-Kuśnierz B., Bajer A., Caccio S., Heropolitańska-Pliszka E., Bernatowska E., van Dongen J., Bednarska M., Paziewska A., Siński E.: Particular susceptibility to *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiency syndromes. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **45**, 458–164 (2007)
98. Xu Y., Weiss L.M.: The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int J. Parasitol.* **35**, 941–953 (2005)
99. Yachnis A.T., Berg J., Martinez-Salazar A., Bender B.S., Diaz L., Rojiani A.M., Eskin T.A., Orenstein J.M.: Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *Am. J. Clin. Pathol.* **106**, 535–543 (1996)

Badania częściowo finansowane przez MNiSW grant nr 404 101036

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 65–81
http://www.pm.microbiology.pl

SZLAK SYGNALIZACYJNY CAMP U SINIC

Aneta Domańska[1]*, Mirosław Godlewski[1]

[1] Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Szlaki sygnalizacyjne cyklicznych nukleotydów u sinic. 2.1. cAMP w komórkach sinic. 2.2. Synteza cAMP u sinic. 2.3. Hydroliza cAMP u sinic. 2.4. Szlak sygnalizacyjny cGMP u sinic. 3. Biologiczna rola cAMP u sinic. 3.1. Rola szlaku cAMP w reakcji na czynniki środowiskowe i w regulacji wzrostu komórek sinic. 3.2. Regulacja transkrypcji przez szlak sygnalizacyjny cAMP u sinic. 4. Podsumowanie

cAMP signaling pathway in *Cyanobacteria*

Abstract: cAMP signaling pathway is a common functional pathway of signal transduction in *Prokaryota* and in *Eukaryota*. Participation of cAMP signaling pathway in the regulation of metabolic processes in cyanobacteria cells has been demonstrated by the studies showing a distinct response of these organisms to exogenous cAMP in the medium. cAMP was detected in cyanobacteria cells with changes in its level dependenting on environmental factors. In these organisms the presence of cAMP synthesis and degradation enzymes (AC and PDE, respectively) was demonstrated and genes encoding proteins involved in signal transduction pathway of cAMP were identified. Currently the sequences of 29 complete genomes of different species of cyanobacteria (and their strains) are known in which different genes connected with cAMP pathway have been identified. There include the genes ecoding AC and PDE cAMP acceptors (CRP), which are transcription factors activated by this nucleotide and genes encoding proteins playing an important role in different physiological processes whose promoters have the CRP binding sequence. These genes encode proteins involved in photosynthesis, carbon metabolism and nitrogen assimilation as well as transporter and porin proteins, protein kinases and transcription factors etc. Current studies of cAMP signaling pathway in cyanobacteria may indicate that it is not a universal pathway regulating cell functioning in the genomes of some cyanobacteria AC, PDE, CRP genes and genes whose activity is regulated by CRP were not detected. However, there is a possibility that their genomes may contain modified, not yet identified sequences encoding individual elements of the cAMP pathway.

1. Introduction. 2. Cyclic nucleotide signaling pathways in cyanobacteria. 2.1. cAMP in cyanobacteria. 2.2. cAMP synthesis in cyanobacteria. 2.3. cAMP hydrolysis in cyanobacteria. 2.4. cGMP signaling pathway in cyanobacteria. 3. Biological role of cAMP in cyanobacteria. 3.1. Role of cAMP pathway in the reaction to environmental factors and in the regulation of cell growth of cyanobacteria. 3.2. Regulation of transcription in cyanobacteria by cAMP signaling pathway. 4. Summary

Słowa kluczowe: cAMP, cGMP, CRP, *Cyanobacteria*, cyklaza adenylanowa, fosfodiesteraza cAMP
Key words: adenylyl cyclase, cAMP, cAMP phosphodiesterase, cGMP, CRP, *Cyanobacteria*

1. Wstęp

Sinice (*Cyanobacteria*) są dużą, zróżnicowaną morfologicznie i ekologicznie grupą Gram-ujemnych autotroficznych *Prokaryota*, u których fotosynteza, podobnie jak u roślin, zachodzi z udziałem chlorofilu *a*, a donorem wodoru jest woda. Część gatunków sinic ma zdolność do wiązania N_2. Sinice skolonizowały zadziwiająco różnorodne siedliska – od przybrzeżnych jezior Antarktyki do gorących, geotermalnych źródeł i od suchych pustyń poprzez wody słodkie do tworzenia zakwitów w morzach. Występują na terenach o różnym naświetleniu, dostępności wody, pokarmu i zasoleniu oraz w warunkach ekstremalnych temperatur i pH. Sinice mogą też tworzyć symbiotyczne asocjacje z organizmami eukariotycznymi, głównie z niższymi i wyższymi roślinami oraz lichenizującymi grzybami.

Zasiedlenie przez sinice tak różnych ekologicznie siedlisk o znacznych zmianach nasilenia oddziaływania czynników środowiskowych wskazuje na ich zdolności adaptacyjne. Przeżycie organizmu w tak zróżnicowanych środowiskach wymaga, więc przystosowań do odbierania pozakomórkowych sygnałów i sprawnie funkcjonującego mechanizmu transdukcji sygnału w komórkach prowadzącego do modyfikacji przebiegu procesów fizjologicznych. U sinic wykazano funkcjonowanie dwu-składnikowego systemu regulacyjnego [2] i kinaz eukariotyczno-podobnych [105].

Istotną rolę w wewnątrzkomórkowej sieci sygnalizacyjnej odgrywa szlak cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP, *adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*). Wykazano, że u ssaków, niższych zwierząt, grzybów i roślin uczestniczy on w regulacji aktywności enzymów, funkcjonowania kanałów jonowych, ekspresji genów, a także w reakcjach na stres abiotyczny i biotyczny [7, 76].

Piśmiennictwo zawiera liczne, chociaż nadal fragmentaryczne, dane wskazujące, że cAMP jest ważnym wtórnym przekaźnikiem w regulacji funkcjonowania

* Autor korespondencyjny: Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki; 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16; tel. 42-635-44-27; fax 42-635-44-23; e-mail: adomansk@biol.uni.lodz.pl

komórek sinic. Wykazano bowiem wyraźną reakcję tych organizmów na egzogenny cAMP, w komórkach sinic wykryto cAMP, a także obserwowano zmiany jego poziomu zależne od czynników środowiskowych. U sinic wykazano też obecność cyklaz adenylanowych (ACs, *adenylyl cyclases*) oraz fosfodiesteraz cAMP (PDEs, *cAMP phosphodiesterases*), które są, odpowiednio, enzymami syntezy i hydrolizy cAMP. Następnie zidentyfikowano w genomach sinic geny kodujące białka zaangażowane w szlak transdukcji sygnału cAMP. Obecność i rola tych genów zastała potwierdzona w badaniach prowadzonych na mutantach sinic, a także na podstawie komplementacji po transdukcji genów sinic do defektywnych mutantów *E. coli*.

Obecnie znana jest pełna sekwencja genomów 29 gatunków sinic (i ich szczepów). Ich analiza pozwoliła na wykazanie obecności genów poszczególnych składników szlaku sygnalizacyjnego cAMP. Zidentyfikowano geny AC i PDE, akceptorów cAMP (CRP, *cAMP receptor protein*), które są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez ten nukleotyd oraz geny kodujące białka pełniące ważną rolę w przebiegu różnych procesów fizjologicznych. Promotory tych genów zawierają sekwencje odpowiedzialne za wiązanie CRP.

W tym przeglądzie zreferowano wyniki badań wskazujących na znaczenie szlaku sygnalizacyjnego cAMP u sinic. Przedstawiono obecność różnych form AC i poznane mechanizmy regulacji aktywności tych enzymów, a także obecność i regulację aktywności PDE. Omówiono też problem występowania cGMP (*guanosine 3,5-cyclic monophosphate*) u sinic. Znaczącą część tego opracowania poświęcono wynikom przeszukiwania zsekwencjonowanych genomów sinic, w których wykazano obecność genów zaangażowanych w szlak cAMP i genów, których ekspresja jest regulowana z udziałem tego szlaku.

2. Szlaki sygnalizacyjne cyklicznych nukleotydów u sinic

2.1. cAMP w komórkach sinic

Obecność cAMP i jego zaangażowanie w regulację licznych procesów komórkowych wykazano u *Prokaryota* i u *Eukaryota*. Na wykorzystanie tego cyklicznego nukleotydu, jako wtórnego przekaźnika w komórkach sinic wskazują z jednej strony badania ze stosowaniem egzogennego cAMP, z drugiej zaś jego obecność w komórkach sinic oraz zmiany poziomu cAMP związane z działaniem czynników środowiskowych.

Stwierdzono, że dodanie cAMP do podłoża hodowlanego powodowało m.in. zmiany morfogenetyczne u *Nostoc muscorum* [53], stymulowało ruchliwość, skupianie się i oddychanie u *Spirulina platensis* [67] oraz tworzenie heterocyst u *Anabaena variabilis* [84].

Obecność cAMP wykryto w komórkach licznych gatunków sinic. H o o d i wsp. [35] stosując kilka metod identyfikacji cAMP stwierdzili, że u *Anabaena variabilis* poziom tego nukleotydu wynosi 0,27–2,7 pmol mg^{-1} białka, przy czym na te stosunkowo niskie wartości mogły mieć wpływ fosfodiesterazy (enzymy hydrolizy cAMP) obecne w ekstraktach z komórek tej sinicy. Stosunkowo niskie stężenie stwierdzono też u *Synechocystis* PCC 6803 (11–24 pmol cAMP mg^{-1} białka) [31]. U innych sinic poziom cAMP był niski lub stosunkowo wysoki, co mogło być gatunkowo-zależne lub związane z warunkami i fazą wzrostu kultur.

Znaczący wpływ na zawartość tego nukleotydu może mieć m.in. dostępność światła, obecność azotu w podłożu, a także dodanie do podłoża hodowlanego NaCl. F r a n c k o i W e t z e l [25] opisali wyraźne różnice zawartości cAMP w komórkach w fazie intensywnego wzrostu i w fazie stacjonarnej kultur *Anabaena flos-aquae,* a także w hodowlach prowadzonych w różnych warunkach oświetlenia. Szybkie i znaczne podwyższenie poziomu cAMP obserwowano po przeniesieniu hodowli *Anabaena cylindrica* ze światła do ciemności, natomiast obniżenie po włączeniu oświetlenia [69]. S a k a m o t o i wsp. [78] stosując technikę radioimmunologiczną porównali zawartość cAMP u *A. cylindrica*, *S. platensis* i *Synechocystis* sp. PCC6803 hodowanych w ciemności i na świetle. W ciemności nitkowate cyjanobakterie *Anabaena cylindrica* i *Spirulina platensis* zawierały wysoki poziom tego nukleotydu (odpowiednio, 179 i 189 pmol mg^{-1} chlorofilu), a w hodowlach na świetle ulegał on kilkakrotnemu zmniejszeniu (odpowiednio do 48 i 51 pmol mg^{-1} chlorofilu). Autorzy nie stwierdzili mierzalnej ilości cAMP u jednokomórkowej *Synechocystis* sp. PCC6803, jednak w późniejszych badaniach wykazano obecność cAMP i wpływ światła na jego zawartość także u tego gatunku [91].

Zmiana poziomu cAMP w komórkach sinic może być zależna od długości fali świetlnej zastosowanego oświetlenia. Efekt szybkiego podwyższenia zawartości cAMP w komórkach *A. cylindrica* i *Anabaena* sp. PCC7120 powoduje daleka czerwień (720 nm), natomiast czerwień (630 nm) obniża poziom tego nukleotydu [71, 72]. Autorzy sugerują, że w tej reakcji na światło może uczestniczyć białko fitochromo-podobne. U jednokomórkowej sinicy *Synechocystis* ekspozycja na światło szybko zwiększała zawartość cAMP i ten efekt uzyskano także po oświetleniu światłem niebieskim (450 nm) [70].

Inne przykłady wpływu zmian w środowisku na poziom cAMP w komórkach sinic pochodzą z badań prowadzonych na kulturach hodowanych na pożywce bez azotu lub z dodaniem NaCl. Przeniesienie *A. flos-aquae* do pożywki bez azotu powodowało podwyższenie komórkowego poziomu cAMP [25]. Podobnie, u *A. variabilis* głodzenie azotowe powodowało 3–5-krotne zwiększenie poziomu cAMP [25, 35]. Doda-

nie NaCl do pożywki szybko, przejściowo podwyższało poziom cAMP u *Anabaena* sp. PCC 7120, a także zwiększało ekspresję genów syntezy otoczki heterocyst poprzez szlak cyklaza adenylanowa-cAMP [38].

cAMP wykryto w środowisku hodowlanym sinic, co świadczy o wydzielaniu tego nukleotydu do podłoża. Obecność pozakomórkowego cAMP wykazano m.in. w hodowlach *Microcystis aeruginosa*, *A. flos-aquae*, *Synecinococcus leopoliensis* [26] i *Spirulina* [66]. Nasilenie tego zjawiska może być bardzo duże. Z oceny poziomu komórkowego i pozakomórkowego cAMP wykonanej dla hodowli *A. variabilis* wynika, że prawie 90% wykrytego nukleotydu stanowił pozakomórkowy cAMP [35]. Sekrecję znacznych ilości cAMP stwierdzono też u *A. flos-aquae*, przy czym to wydzielanie było ok. 10-krotnie większe przez komórki w stacjonarnej fazie wzrostu kultury w porównaniu z komórkami w aktywnej fazie wzrostu [25]. *A. cylindrica i Spirulina platensis* wydzielają znaczne ilości cAMP w ciemności i na świetle [78]. W badaniach prowadzonych na *S. platensis* intensywniejsze i szybsze wydzielanie stwierdzono w ciemności niż w oświetlanych hodowlach. Po 60 minutach od zmiany warunków oświetlenia (światło/ciemność) w ciemności podłoże hodowlane zawierało ok. 300 pmol mg^{-1} chlorofilu (4,2 nmol $litr^{-1}$ pożywki), a na świetle ok. 200 pmol mg^{-1} chlorofilu (2,8 nmol $litr^{-1}$ pożywki). Analogicznie u *E. coli* ponad 90% cAMP zsyntetyzowanego przez wewnątrzkomórkową cyklazę adenylanową wykryto w środowisku hodowlanym [29].

Rola wydzielania cAMP do środowiska przez sinice nie jest znana, chociaż na fizjologiczne znaczenie tego zjawiska może wskazywać ilość pozakomórkowego cAMP, która często była wyraźnie większa niż jego zawartość w komórkach. Wiadomo, że u ssaków cAMP jest wydzielany przez komórki różnych tkanek i wykazano, że może być on wykorzystywany, jako pierwotny przekaźnik i jako substrat, który ulega konwersji do adenozyny będącej innym pierwotnym przekaźnikiem. U ssaków zidentyfikowano receptory błonowe dla tych ligandów [58]. Opisano też wydzielanie i wykorzystanie cAMP, jako cząsteczki sygnałowej podczas tworzenia wielokomórkowych ciał owocujących u jednokomórkowego śluzowca *Dictyostelium discoidium* (*Myxomycetes*) [77]. U bakterii pasożytniczych wydzielanie cAMP może być jednym z mechanizmów oddziaływania na komórki gospodarza [3]. Przypuszcza się, że wydzielanie cAMP przez sinice może mieć nieopisane jeszcze znaczenie w adaptacji do warunków środowiska, może też mieć analogiczny wpływ na fenotyp sinic, jaki obserwowano po dodaniu do pożywki egzogennego cAMP.

2.2. Synteza cAMP u sinic

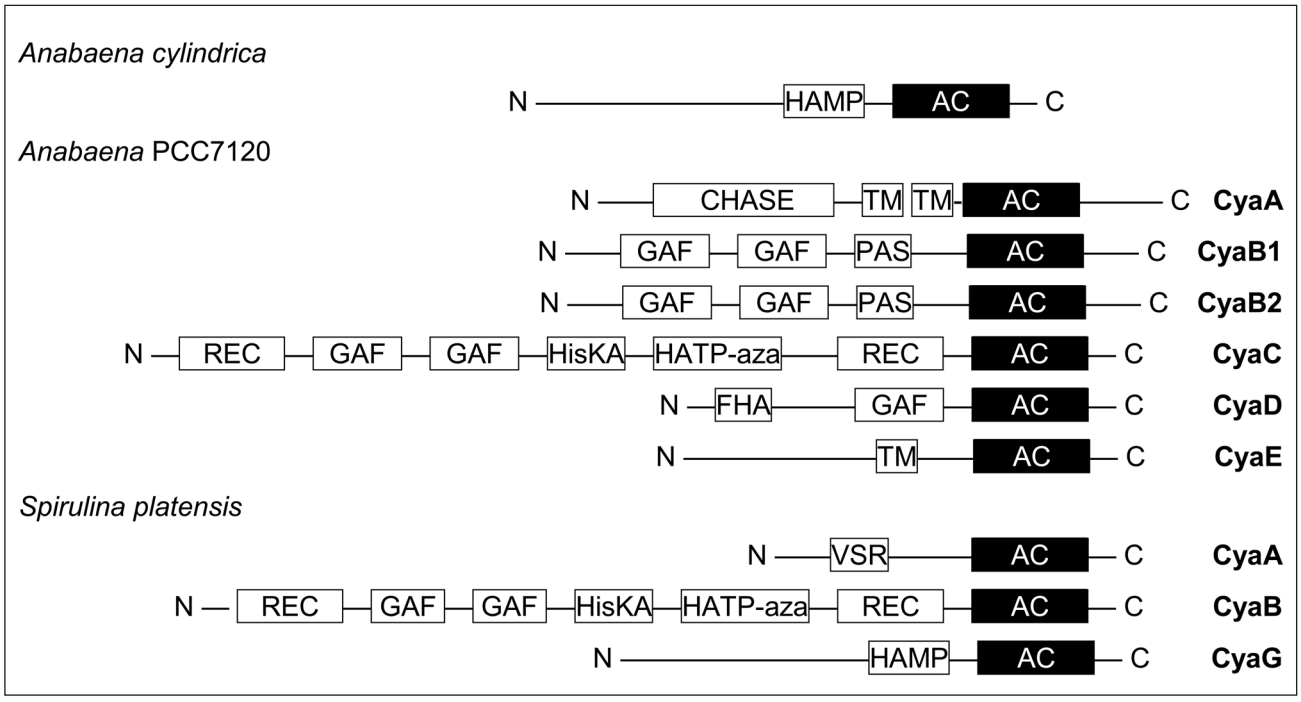
Cyklaza adenylanowa (AC) odgrywa kluczową rolę w szlaku transdukcji sygnału cAMP, katalizuje bowiem cyklizację ATP do cAMP, podwyższa poziom tego wtórnego przekaźnika i w ten sposób włącza sygnał szlaku cAMP. Obecność AC wykazano zarówno u *Prokaryota* jak i u *Eukaryota*. U ssaków funkcjonuje, co najmniej 10 różnych izoform AC, z których dziewięć jest zlokalizowanych w błonie komórkowej (tmAC; *transmembrane AC*) [75], a jedna funkcjonująca wewnątrz komórek jest tzw. rozpuszczalną AC (sAC; *soluble AC*) [108].

Cyklazy nukleotydów purynowych (AC i GC; cyklaza adenylanowa i cyklaza guanylanowa) tworzą stosunkowo dużą rodzinę białek i ze względu na znaczne zróżnicowanie ich struktury I-rzędowej, na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej zostały one podzielone na sześć filogenetycznie zdefiniowanych klas [4, 5, 23, 24, 83, 89]. Klasę I tworzą AC obecne u *Enterobacteria*, np. u *E. coli*. Mają one wspólną organizację N-terminalnej domeny katalitycznej i wszystkie posiadają C-terminalną, glukozo-wrażliwą domenę regulacyjną. U sinic domenowa struktura AC jest inna a domena katalityczna nie jest homologiczna z AC *E. coli*. Klasa II AC jest obecna tylko u patogennych bakterii produkujących toksyny (np. *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis* i *Pseudomonas aeruginosa*). Enzymy tej klasy są aktywowane przez kalmodulinę komórek gospodarza. Najbardziej rozpowszechnioną klasą AC jest obecna u wszystkich *Eukaryota* i niektórych bakterii (np. *R. meliloti* i *S. aurantiaca*) klasa III AC. Enzymy tej klasy mają wspólną domenę katalityczną i do niej zaliczane są AC sinic, ponieważ ich domena katalityczna jest homologiczna z tą domeną AC eukariontów. Ta klasa obejmuje też GC ssaków. Klasę IV tworzy AC zidentyfikowana u *Aeromonas hydrophila*, klasa V AC jest obecna tylko u obligatoryjnej anaerobowej bakterii *Prevotella ruminicola*, natomiast klasę VI tworzą AC zidentyfikowane w genomie *Rhizobiaceae*.

AC zidentyfikowano u licznych gatunków *Prokaryota* [5]. Pierwsze dowody obecności AC u sinic pochodzą z badań, w których wykrywano aktywność tego enzymu w ekstraktach z komórek. W ten sposób zidentyfikowano AC m.in. u *Anacystis nidulans* [34], *Anabaena cylindrica* i u *Spirulina platensis* [78]. Stwierdzano też pozytywną korelację między aktywnością AC a poziomem cAMP w komórkach.

Istotny postęp w poznaniu AC sinic nastąpił po zastosowaniu metody identyfikacji genów AC, w której przeniesienie genów sinic do defektywnych mutantów *cya⁻ E. coli* (która ma tylko jeden gen AC) powodowało produkcję cAMP [93]. Pierwsze eksperymenty komplementacji przeprowadzono z DNA *A. cylindrica*, co pozwoliło na identyfikację genu AC uczestniczącego w zmianie poziomu cAMP po przeniesieniu tych sinic ze światła do ciemności. Ten gen koduje białko, które oprócz domeny katalitycznej homologicznej z AC klasy III, ma podwójną domenę transbłonową i wykazuje immunolokalizację w błonach tylakoidów [47].

U *Spirulina platensis* metodą komplementacji genomowej biblioteki DNA tej sinicy do mutanta *cya⁻ E. coli*



Rys. 1. Domenowa struktura AC sinic określona metodą komplementacyjnego klonowania

Struktura domenowa AC została sporządzona z użyciem SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) i danych z literatury [wg 17 i 70]. AC – domena katalityczna AC; FHA – domena rozwidlonej głowy (*forkhead-associated domain*); GAF – domena obecna w PDE cGMP, cyklazie adenylanowej i domenie FhlA (*formate hydrogen lyase transcriptional activator*); HAMP – domena obecna w kinazie histydynowej, cyklazie adenylanowej, białku wiążącym grupę metylową i w fosfatazach; HATPaza – domena kinazy histydyno-podobnej ATPazy (*ATPase domains of histidine kinase*); HisKA – domena dimeryzacji i fosfoakceptora kinazy histydynowej; PAS – domena obecna w białku PAR (*period circadian protein*), w białku ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)* i białku SIN (*single-minded protein*); REC – domena odbiornika regulacji odpowiedzi (*response regulator receiver domain*); (homologiczna z cheY); VSR – domena podobna do pozakomórkowego regionu VsrA ORF (*open reading frame*) *Pseudomonas solanacearum*; CHASE – przypuszczalna domena wiązania ligandu; TM – domeny transbłonowe AC (u *Anabaena* sp. PCC 7120)

zidentyfikowano sześć fragmentów DNA zawierających geny AC, które wywoływały akumulację cAMP u tego mutanta [99]. Jeden z tych genów (*cyaA*) koduje AC z C-terminalną domeną katalityczną AC, która ma przejście transbłonowe i N-terminalny region pozakomórkowy. Inny gen (*cyaC*) koduje białko z C-terminalną domeną katalityczną AC klasy III, ale w części N-terminalnej posiadające kilka domen, takich jak: dwie domeny odbiornikowe (R1 i R2), dwie domeny podobne do ETR1 u *Arabidopsis* i domenę przekaźnikową kinazy histydynowej [44]. Domena przekaźnikowa CyaC o właściwościach kinazy histydynowej posiada miejsce fosforylacji, jest zdolna do przeniesienia grupy fosforanowej i autofosforylacji reszt asparaginianowych w domenach odbiornikowych (R1 and R2). Trzeci fragment DNA pochodzący ze *Spirulina platensis*, który komplementował u *cya*⁻ *E. coli*, zawierał gen *cyaG* [43]. CyaG ma także C-terminalną domenę katalityczną AC klasy III, a w regionie N-terminalnym domenę homologiczną z domeną dimeryzacji, a także pojedynczą domenę transbłonową i domenę pozakomórkową.

Badania przeprowadzone metodą komplementacji u *cya*⁻ *E. coli* pozwoliły na identyfikację w genomie *Anabaena* PCC 7120 pięciu genów [43, 46], a szósta AC tej sinicy została zidentyfikowana podczas przeglądu genomu *Anabaena* [43, 68]. Te sześć AC *Anabaena* PCC 7120 (*cyaA*, *cyaB1*, *cyaB2*, *cyaC, cyaD* i *cyaE*) ma różną strukturę domenową cząsteczek (Rys. 1).

Metoda komplementacji w *cya*⁻ *E. coli* pozwoliła na identyfikację AC u różnych gatunków sinic, ale pełniejsze poznanie różnorodności genów kodujących AC u poszczególnych gatunków umożliwiło przeszukiwanie zsekwencjonowanych genomów tych organizmów. Taką analizę genomu wykonano dla *Anabaena* sp. PCC 7120 [68]. Analizę 21 całkowicie zsekwencjonowanych genomów jednokomórkowych i nitkowatych sinic przeprowadzili W u i wsp. [96]. Ci badacze wykorzystali *IMG database* (http://img.jgi.doe.gov/) i dla identyfikacji genów AC stosowali kombinację przeszukiwań opartych na systemach BLAST (*BLAST-based*) i HMM (*HMM-based*). Dzięki zastosowaniu tej metody, która wykorzystuje homologię sekwencji zidentyfikowano ogółem 51 cyklaz nukleotydów purynowych.

Badania W u i wsp. [96] wykazały, że genomy poszczególnych gatunków sinic mają różną liczbę genów cyklaz, przy czym u nitkowatych sinic jest ona większa niż u sinic jednokomórkowych. U jednokomórkowych sinic nie przekracza ona trzech, a u nitkowatych wahała się od pięciu u *Anabaena variabilis* ATCC 29413 do trzynastu cyklaz u *Trichodesmium erythraeum* IMS101

Tabela I

Cyklazy nukleotydów purynowych zidentyfikowane w genomach sinic nitkowatych i jednokomórkowych [wg 96]

Gatunek	Liczba cyklaz / ORF	*Locus tag*
Sinice nitkowate *Trichodesmium erythraeum* IMS101	13/5076	*Tery_0400, Tery_0647, Tery_0661, Tery_0662, Tery_1986, Tery_2417, Tery_2729, Tery_2857, Tery_3155, Tery_3412, Tery_3993, Tery_3999, Tery_4585*
Nostoc punctiforme PCC73102	8/7364	*NpR0352, NpR0896, NpR1313, NpR1485, NpF2925, NpR3592, NpR4632, NpF5680*
Anabaena PCC 7120	6/6132	*all0661*(CyaE), *all0743*(CyaD), *all1118*(CyaA), *all1904*(CyaB2), *alr2266*(CyaB1), *all4963*(CyaC)
Anabaena variabilis ATCC 29413	5/5746	Ava0091, Ava2239, Ava3735, Ava4645, va4698
Sinice jednokomórkowe *Crocosphaera watsonii* WH8501	3/5077	*cwat1781, cwat2344, cwat2721*
Synechocystis sp. PCC 6803	3/3564	*sll1161*(Cya3), *sll0646*(Cya2), *slr1991*(Cya1)
Gloeobacter violaceus PCC 7421	1/4430	*gll0479*
Synechococcus elongatus PCC 6301	2/2525	*syc0865_c, syc1902_d*
Synechococcus elongatus PCC 7942	2/2613	*Syn2195, Syn0663*
Thermosynechococcus elongatus BP-1	2/2475	*tll2280, tll2410*
Synechococcus sp. JA-3-3Ab	1/2760	*CYA_2405*
Synechococcus sp. JA-2-3Ba	1/2862	*CYB_2200*
Synechococcus sp. CC9605	1/2702	*Syn_cc2515*
Synechococcus sp. CC9311	1/2892	*sync_2745*
Prochlorococcus marinus MIT 9313	2/2275	*PMT2146, PMT2152*

Ogólna liczba ORF (*open reading frame*) uzyskana z *IMG database*.
Nie zidentyfikowano cyklaz nukleotydów purynowych u: *Synechococcus* sp. CC9902, *Synechococcus* sp. WH 8102, *Prochlorococcus marinus* CCMP1986, *Prochlorococcus marinus* MIT 9312, *Prochlorococcus marinus* NATL2A i *Prochlorococcus marinus* CCMP1375

(Tabela I). Typowych cyklaz nie wykryto w genomach dziesięciu szczepów (z 12 badanych) morskiej sinicy *Prochlorococcus* i czterech szczepów (z 8 badanych) *Synechococcus*. Autorzy sugerują, że genomy tych sinic mogą zawierać cyklazy, które nie są wykrywalne na podstawie zastosowanej przez nich metodyki.

Większa liczba genów AC w genomach nitkowatych w porównaniu z sinicami jednokomórkowymi może być związana ze znacznie większymi rozmiarami ich genomów [51]. Podobna sytuacja dotyczy też kinaz serynowo/treoninowych sinic [105], czynników transkrypcyjnych [97] i genów restrykcyjno-modyfikacyjnych [106]. Takie zwiększenie liczby cyklaz u nitkowatych sinic może być też związane z zaangażowaniem różnych cyklaz w bardziej złożoną biologię tych organizmów (np. tworzenie heterocyst, oddychanie lub ruch ślizgowy) [16].

Z badań prowadzonych na różnych organizmach wynika, że białka uczestniczące w komórkowej transdukcji sygnałów często mają strukturę domenową [2, 105]. Taką domenową strukturę białek AC wykazano też u większości sinic (Rys. 1). Wszystkie AC u sinic mają dobrze zachowaną cyklazową domenę katalityczną w pobliżu *C*-końca i mogą mieć różne domeny regulacyjne zlokalizowane powyżej tej domeny (Rys. 1).

Badania genomów sinic [96] wykazały, że wśród 51 zidentyfikowanych genów AC 5 kodowało białka zawierające tylko domenę katalityczną, a pozostałe białka AC mają ogółem 13 typów dodatkowych domen, które tworzą 14 różnych wzorów. Te dodatkowe domeny dzięki wiązaniu różnych ligandów mogą regulować aktywność katalityczną AC. W u i wsp. [96] przeprowadzili szczegółową charakterystykę domenowej struktury cyklaz zidentyfikowanych w poszczególnych genomach sinic, porównali ich strukturę z cyklazami opisanymi u innych organizmów oraz zaproponowali drzewo filogenetyczne cyklaz sinic.

Allosteryczna regulacja aktywności AC. Analiza 21 genomów sinic wykazała obecność ogółem 51 różnych AC [96], ale piśmiennictwo zawiera tylko fragmentaryczne dane opisujące mechanizm regulacji ich aktywności. U *Anabaena* PCC7120 cyklazy CyaB1 i CyaB2, oprócz domeny katalitycznej, mają domenę PAS i w *N*-końcowej części cząsteczki tandem domen GAF (Rys. 1). Domeny GAF tych cyklaz wiążą (odpowiednio, jedną lub dwie) cząsteczki cAMP i uczestniczą w allosterycznej ich aktywacji [12, 18, 41, 59]. Domena GAF jest, więc wykorzystywana w autoregulacji syntezy cAMP. Aktywację tych AC przez wiązanie cAMP może zakłócić wysokie stężenie jonów Na^+ [18]. Jony Na^+

specyficznie hamują aktywność obu cyklaz, ponieważ wiążą się z domeną GAF, zmieniają konformację tandemu tych domen i osłabiają pozytywną autoregulację przez niskie stężenia cAMP (< 1 μM). Wykazano, że u tej sinicy wysokie stężenie Na^+ (4 mM) działa negatywnie na autoregulację CyaB1 i CyaB2 przez cAMP, natomiast obniżenie stężenia Na^+ (0,2 mM) uwalnia Na^+ z GAF i przywraca tę autoregulację [18].

Białko cyklazy adenylanowej CyaC u *Spirulina platensis* ma unikalną strukturę pierwszorzędową, zawiera bowiem, oprócz domeny katalitycznej AC, domeny bakteryjnego dwu-składnikowego systemu regulacyjnego: jedną domenę przekaźnika i dwie domeny odbiornika [44, 46]. Domena przekaźnika ma aktywność kinazy histydynowej zdolnej do przeniesienia grupy fosforanowej i autofosforylowania reszt asparaginianowych domeny odbiornika. Autofosforylacja aktywuje tę cyklazę adenylanową.

Regulacja aktywności AC przez światło. Światło jest istotnym czynnikiem środowiskowym w biologii sinic, podobnie jak u innych organizmów fotoautotroficznych. Sinice dzięki zdolności do ruchu mogą adaptować się do warunków świetlnych i w tej reakcji może pośredniczyć cAMP. Na taką możliwość wskazują badania, w których stwierdzono zmianę poziomu cAMP spowodowaną natężeniem i barwą światła. Wykazano, że zmiany poziomu cAMP w komórkach mogą być związane z wpływem światła na aktywność AC (lub aktywność PDE).

U *Spirulina platensis* i *Anabaena cylindrica* wyższą zawartość cAMP stwierdzono w ciemności niż na świetle [78]. U *A. cylindrica* znaczne podwyższenie poziomu tego nukleotydu obserwowano już po 1 min po przeniesieniu hodowli ze światła do ciemności [69]. W badaniach prowadzonych na tej sinicy wykazano, że przeniesienie hodowli z ciemności do światła o długości fali bliskiej UV (340 nm), światła niebieskiego (450 nm) i światła czerwonego (630 nm) powoduje szybkie obniżenie koncentracji cAMP w komórkach [71], natomiast daleka czerwień (730 nm) powodowała szybkie (1 min) zwiększenie poziomu cAMP. Obniżenia poziomu cAMP po przeniesieniu z ciemności do światła (białego) nie stwierdzono u mutanta *Anabaena* PCC 7120 z defektywnym genem *cyaC* [46], co wskazuje na zaangażowanie tej cyklazy w reakcję na światło.

Światło niebieskie (450 nm) podwyższa poziom cAMP u *Synechocystis* 6803 i stymuluje ruchliwość komórek tej sinicy [91]. Wykazano, że światło niebieskie wpływa na aktywność Cya1 u *Synechocystis* sp. PCC 6803 [91], jednak oczyszczone białko tej cyklazy nie reaguje na światło, nie zawiera, więc chromoforu. Ta obserwacja sugeruje, że kontrola aktywności tej AC może zachodzić z udziałem fototropiny i kryptochromu, które mogłyby reagować na światło niebieskie i oddziaływać z N-terminalnymi domenami Cya1 [61]. W genomie *Synechocystis* 6803 zidentyfikowano dwa geny (*slr0854* i *sll1629*) kodujące białko o sekwencji aminokwasowej podobnej do fotoliazy, jednak mutacje tych genów nie wpływały na reakcję na światło niebieskie. Dotychczas nie udało się zidentyfikować receptora światła niebieskiego u sinic [70].

Światło niebieskie (450 nm) zwiększa poziom cAMP u *Synechocystis* 6803, natomiast działania takiego nie stwierdzono u *Anabaena cylindrica* [71, 91]. Sugeruje to różnice w percepcji światła u tych dwóch gatunków sinic. U *Anabaena* sp. PCC7120 światło czerwone obniża, natomiast daleka czerwień podwyższa poziom cAMP, co sugeruję kontrolę aktywności AC przez światło i że fitochrom jest zaangażowany w regulację aktywności AC [72]. U tej sinicy zidentyfikowano fitochromo-podobne białko AphC, które odbiera sygnał dalekiej czerwieni, przenosi go na N-terminalną domenę odbiornikową cyklazy adenylanowej CyaC i powoduje stymulację jej aktywność [72]. Z tej obserwacji wynika, że u *Anabaena* daleka czerwień aktywuje, natomiast światło czerwone inaktywuje AC, a więc to fitochromo-podobne białko funkcjonuje inaczej niż fitochrom u roślin wyższych, u których aktywująco działa światło czerwone, a daleka czerwień inaktywuje fitochrom.

Analiza genomu *Synechocystis* sp. PCC 6803 wykazała obecność genu kodującego białko fitochromo-podobne, które na oświetlenie światłem czerwonym i daleką czerwienia reaguje pobobnie jak białko AphC u *Anabaena* [2, 100]. Wykryte u *Synechocystis* sp. PCC 6803 białko Cph1 ma domenę kinazy histydynowej [100] i reakcja fosfotransferu z Cph1 do Rcp1 (regulatora reakcji fitochromu sinicy) zachodzi, kiedy Cph1 absorbowało daleką czerwień, natomiast światło czerwone hamowało tę reakcję [100].

Uzyskano też dane wskazujące, że adaptacja chromatyczna u nitkowatej sinicy *Fremyella diplosiphon* jest regulowana przez fitochromo-podobny receptor (RcaE) [49].

Regulacja aktywności AC przez CO_2. W komórkach ssaków, oprócz tmAC [75] regulowanej przez heterotrimerowe białka G, funkcjonuje sAC aktywowana przez HCO_3^- i Ca^{2+} [22, 39, 108]. W biologii sinic jony HCO_3^- mają podstawowe znaczenie, ponieważ ten nieorganiczny węgiel jest akumulowany w komórkach i transportowany do karboksysomów. Jony HCO_3^- mogą indukować lub hamować aktywność niektórych AC u sinic.

Pierwszą AC u sinic, u której stwierdzono aktywację przez HCO_3^- była CyaC u *Spirulina platensis* [22]. Wykazano też, że CyaB1 u *Anabaena* sp. PCC7120 jest specyficznie stymulowana przez jony HCO_3^- [17], a mutacja punktowa (Lys-646) kodującego ją genu prawie całkowicie redukuje tę aktywację. Przez HCO_3^- jest też aktywowana cyklaza adenylanowa CyaB u *Stigmatella aurantiaca* [17]. W przypadku Cya1 u *Synechocystis* sp. PCC 6803 stwierdzono hamowanie aktywności przez HCO_3^- [60]. Badania Hammer i wsp. [28] wykazały, że cyklaza adenylanowa Slr1991 (Cya1) u *Synecho-*

cystis PCC 6803 i cyklaza adenylanowa CyaB1 u *Anabaena* PCC 7120 są aktywowane raczej przez CO_2 a nie przez jony HCO_3^-.

2.3. Hydroliza cAMP u sinic

Poziom cAMP u sinic, podobnie jak i u innych organizmów, zależy z jednej strony od aktywności cyklazy adenylanowej, z drugiej zaś od aktywności fosfodiesterazy cAMP (PDE; EC 3.1.4.17), która hydrolizuje ten cykliczny nukleotyd do 5'-AMP. W ten sposób AC włącza, a PDE wyłącza sygnał cAMP w komórkach.

U *Eukaryota* PDE są dużą zróżnicowaną grupą enzymów, którą podzielono na dwie klasy (I i II) [6], natomiast o PDE *Prokaryota* wiadomo niewiele. PDE wykryte u *E. coli* (CpdA) i u *Haemophilus influenzae* zostały zakwalifikowane do dodatkowej klasy III, natomiast PDE *Vibrio fisheri* (CpdP) do eukariotycznej klasy II.

Już w 1974 roku aktywność PDE cAMP (PDE hydrolizujące cAMP) wykryto w ekstraktach z komórek *Anacystis nidulans* i *A. cylindrica* [1], a następnie jej wysoką aktywność stwierdzono u *A. variabilis* hodowanej na podłożu pozbawionym azotu [74]. Zależną od poziomu ogólnego cAMP w komórkach aktywność PDE cAMP wykazano też u *A. cyclindrica* i *Spirulina platensis,* a jej niska aktywność u *Synechocystis* sp. PCC6803 była skorelowana z niskim poziomem cAMP u tej sinicy [78].

PDE obniża poziom cAMP w komórkach. Hamowanie jej aktywności może zwiększać zawartość tego nukleotydu i w ten sposób wpływać na procesy komórkowe regulowane przez szlak cAMP. U *Spirulina platensis* efekt fenotypowy (ruch i skupianie się nici) obserwowano po dodaniu do podłoża cAMP lub IBMX (3-izomaślano-1-metyloksantyna), która jest inhibitorem PDE u *Eukaryota* [67]. Obie substancje podobnie (chociaż cAMP nieco silniej) podwyższały poziom cAMP w komórkach i stymulowały ruchliwość tej sinicy. Hamowanie aktywności PDE sinicy przez ten inhibitor sugeruje, że przynajmniej ta PDE może być podobna do PDE *Eukaryota*.

Fujisawa i Ohmori [27] określili biochemiczne właściwości PDE u *Anabaena* sp. PCC 7120. Zidentyfikowali oni gen (*alr5338*), który jest homologiem genu PDE *E. coli* i który nazwali *cpdA*. Obecności takiego homologa nie stwierdzono u *Synechocystis* sp. PCC6803, autorzy sądzą więc, że ta sinica ma inny typ PDE. PDE *Anabaena* jest białkiem 266-aminokwasowym podobnym (identyczność 33,5–35,3%) do PDE *Thermosynechococcus elongates, Haemophilus influenzae* i *E. coli* [27]. Wyizolowane białko PDE z *Anabena* (35 kDa) wykazuje maksymalną aktywność *in vitro* przy 1 mM stężeniu cAMP, natomiast w komórkach PDE może być aktywna przy stężeniu 45 μM cAMP podobnie jak u *E. coli*. Aktywność PDE *Anabaena* sp. PCC 7120 jest stymulowana przez kationy Fe^{2+} i Mn^{2+}. Określenie preferencji substratowej wskazuje, że PDE *Anabaena* sp. PCC 7120 hydrolizuje zarówno cAMP jak i cGMP.

2.4. Szlak sygnalizacyjny cGMP u sinic

Szlak sygnalizacyjny cGMP (*guanosine 3,5-cyclic monophosphate*) i jego rola u sinic była mniej intensywnie badana niż szlak cAMP, tym niemniej obecność tego cyklicznego nukleotydu oraz enzymów jego syntezy i degradacji wykazano u co najmniej kilku gatunków tych organizmów.

cGMP (analogicznie jak cAMP) jest wtórnym przekaźnikiem w transdukcji sygnału w komórkach niższych i wyższych roślin i zwierząt. Jest on syntetyzowany przez cyklazy guanylanowe (GC, *guanylyl cyclase*; EC 4.6.1.2), a hydrolizowany przez fosfodiesterazy cGMP (PDE, *phosphodiesterases cGMP*). cGMP uczestniczy w regulacji procesów komórkowych, rozwojowych i pośredniczy w adaptacyjnych reakcjach komórek *Eukaryota*, m.in. poprzez wpływ na funkcjonowanie kanałów jonowych i przez aktywację cGMP-zależnej serynowo-treoninowej kinazy proteinowej [48, 56].

Badania zawartości cGMP wykazały, że komórki *Synechocystis* PCC 6803 zawierają 3,5–6,0 pmol mg^{-1} białka tego nukleotydu, a jego poziom zwiększał się do ok. 9,5 pmol mg^{-1} białka podczas hodowli w miksotroficznych warunkach i do 20 pmol mg^{-1} białka po przeniesieniu do pożywki bez azotu [31]. W badaniach prowadzonych na innych sinicach poziom cGMP był następujący: *Synechocystis* PCC 6308 zawierała 17–35 pmol mg^{-1} białka, *Plectonema* PCC 73110 – 4 pmol mg^{-1} białka, a *Nostoc* PCC 8009 – 1–3,5 pmol mg^{-1} białka [31].

cGMP jest syntetyzowany przez cyklazy guanylanowe (GC). Molekularna charakterystyka tych enzymów pozwoliła na wyróżnienie u *Eukaryota* trzech typów GC (94):

1) zidentyfikowaną u wyższych *Eukaryota* formę rozpuszczalną, będącą heterodimerem podjednostek α i β, która jest zaangażowana w reakcje komórek na NO,
2) zidentyfikowane u *Eukaryota* izoformy, które mają pozakomórkową domenę wiązania ligandu, pojedynczą domenę transbłonową i wewnątrzkomórkową domenę homologiczną z kinazą oraz cyklazową domenę katalityczną, oraz
3) liczne zidentyfikowane u niektórych niższych *Eukaryota* formy GC z domeną transbłonową.

Cyklazy GC mogą być zaliczone do klasy III cyklaz adenylanowych, ponieważ ich katalityczna cyklazowa domena jest podobna do katalitycznych domen cyklazowych tej klasy AC [5].

U sinic cyklazę GC-podobną początkowo wykryto tylko u *Synechocystis* PCC 6803, jako jedyną GC u *Prokaryota*, później w jej genomie zidentyfikowano gen *sll0646*, który prawdopodobnie koduje GC i którego mutacja znacznie zmniejszała akumulację cGMP w komórkach [65]. Analiza 21 zsekwencjonowanych genomów sinic pozwoliła na identyfikację innych prawdopodobnych genów GC [96]. W tych badaniach

uwzględniono znaczne zróżnicowanie struktury pierwszorzędowej domeny katalitycznej cyklaz nukleotydów purynowych, które jednak zawierają konserwatywne trzy grupy reszt aminokwasowych warunkujących ich katalityczne właściwości [4, 81]. Badania wzoru substytucji tych ważnych reszt wykazały, że 42 cyklazy zidentyfikowane w genomach sinic zawierały wszystkie reszty charakterystyczne dla AC, natomiast nie zawierała ich cyklaza sll1161 u *Synechocystis* sp. PCC 6803 i cyklaza cwat1781 u *Crocosphaera watsonii* WH8501. Z wcześniejszych badań wiadomo, że AC i GC odróżniają pary reszt: GC zawiera pary Glu-Gly lub Glu-Thr, zaś AC pary Lys-Asp lub Lys-Thr [4, 82, 85]. Analiza genomów sinic przeprowadzona przez W u i wsp. [96] wykazała, że, oprócz GC (*sll0646*) zidentyfikowanej u *Synechocystis* sp. PCC 6803 [64] zawierają one sześć innych genów prawdopodnych cyklaz guanylanowych, a mianowicie: u *Anabaena* PCC7120 (*all1118*), *Anabaena variabilis* ATCC29413 (*Ava4698*), *Nostoc punctiforme* PCC73102 (*NpR1313* i *NpR0352*) oraz u *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (*Tery3412* i *Tery4585*). Te cyklazy mają region transbłonowy, są więc prawdopodobnie cyklazami związanymi z błoną.

Obecność fosfodiesterazy cGMP badano tylko u nielicznych gatunków sinic. Analiza *null* mutantów *Synechocystis* PCC 6803 pozwoliła na identyfikację dwóch genów (*sll1624* i *slr2100*), z których gen *slr2100* może kodować fosfodiesterazę cGMP [14]. W badaniach prowadzonych na *Anabaena* sp. 7120 zidentyfikowano PDE (*cpdA*), która hydrolizuje zarówno cAMP jak i cGMP [27]. Obecności homologa tej PDE nie stwierdzono u *Synechocystis* sp. PCC6803 i autorzy sądzą, że ta cyjanobakteria ma inny typ PDE.

Chociaż cGMP wykryto w komórkach sinic, nie została określona funkcja tego nukleotydu. cGMP dodany do pożywki nie powodował efektów fenotypowych [16]. Działanie specyficzne dla tego nukleotydu obserwowano w badaniach *null* mutantów *Synechocystis* PCC 6803, w których zidentyfikowano gen *slr2100*, który prawdopodobnie koduje PDE cGMP. Stwierdzono też, że ten gen jest potrzebny w adaptacji komórek podczas stresu UV-B [14]. Wskazuje to na ważną rolę szlaku sygnalizacyjnego cGMP w procesie fotoaklimatyzacji podczas stresu UV-B.

3. Biologiczna rola cAMP u sinic

3.1. Rola szlaku cAMP w reakcjach na czynniki środowiskowe i w regulacji wzrostu komórek sinic

Sinice zasiedlają różne środowiska wodne i lądowe o znacznych zmianach nasilenia oddziaływania czynników środowiskowych. Przeżycie organizmu w tych środowiskach wymaga zdolności do odbierania pozakomórkowych sygnałów, ich transdukcji w komórkach i modyfikacji procesów fizjologicznych. Istotną rolę w wewnątrzkomórkowej sieci sygnalizacyjnej, która uczestniczy w regulacji procesów komórkowych w dpowiedzi na sygnały pozakomórkowe u ssaków, niższych zwierząt, grzybów i roślin, pełni szlak sygnalizacyjny cAMP. Wykazano, że ten szlak może regulować aktywność enzymów, funkcjonowanie kanałów jonowych, ekspresję genów, uczestniczy, więc w regulacji licznych procesów fizjologicznym, w tym proliferacji komórek i w reakcji na stres abiotyczny i biotyczny [7, 48, 76].

cAMP uczestniczy w regulacji funkcjonowania komórek sinic, w ich adaptacji do warunków środowiskowych, o czym świadczą znaczne zmiany poziomu tego cyklicznego nukleotydu w komórkach indukowane czynnikami środowiskowymi. Obserwowano je m.in. w reakcjach na zmiany: światło-ciemność, niskie-wysokie pH, warunki tlenowe-beztlenowe, głodzenie-dostępność pokarmu [70, 71]. Uzyskano dane wskazujące, że cAMP pośredniczy w regulacji m.in. wzoru tworzenia heterocyst, intensywności oddychania, ruchu i reakcji na światło, pH [17] i odwodnienia/uwodnienia komórek [32].

Ruch w reakcji na światło. Podobnie jak u innych organizmów autotroficznych, światło ogrywa istotną rolę w biologii sinic. Sinice po odebraniu sygnału świetlnego na drodze fototaksji mogą adaptować się do warunków oświetlenia. Liczne gatunki sinic poruszają się ruchem ślizgowym (*gliding*), drganiem (*twithing*) lub pływaniem (*swimming*) [70]. Sinice nie tworzą wici jak np. *E. coli*, natomiast używają wytworów powierzchniowych typu pili. Ruchem szybowcowym poruszają się nitkowate sinice, np. *Spirulina* i *Oscillatoria*, morska jednokomórkowa *Synechococcus* sp. WH8102 porusza się przez pływanie (w czym wykorzystywane jest powierzchniowe białko SwmA), a *Synechocystis* 6803 wykonuje ruchy drgania (do czego u jest potrzebna PilA1, która jest strukturalnym składnikiem pili typu IV oraz ATPaza PilT).

Szlak sygnalizacyjny cAMP uczestniczy w regulacji ruchu sinic. Egzogenny cAMP stymuluje ruchliwość *Synechocystis* 6803 [90] i ruch szybowania u *Spirulina platensis* [67]. O zaangażowaniu szlaku cAMP w regulacji ruchliwości sinic świadczą badania prowadzone na mutantach *Synechocystis* 6803. Mutanty *cya1* tej sinicy, które mają 5-krotnie niższy poziom cAMP od szczepu dzikiego, nie mają zdolności do poruszania się, a dodanie cAMP do pożywki przywraca tę zdolność [90]. Unieruchomienie komórek tej sinicy następowało też po mutacji genu *sycrp1* kodującego białko receptora cAMP [104]. Badania ultrastruktury wykazały, że ten mutant ma zredukowaną liczbę grubych pili.

Obserwacje prowadzone na *Synechocystis* 6803 wykazały, że ruchliwość sinic może zależeć od barwy światła. Na płytkach agarowych przy oświetleniu światłem czerwonym poruszało się tylko 24% komórek, natomiast

przy oświetleniu światłem niebieskim ruchy wykonywało 63% komórek [91]. Reakcja na światło niebieskie była związana z szybkim podwyższenie poziomu cAMP, a mutanty *cya1* prawie nie reagowały na światło. Te wyniki dostarczają mocnego dowodu, że system transdukcji sygnału światło niebieskie-cAMP reguluje ruchliwość tej sinicy, że w tę reakcję jest zaangażowana Cya1, a także, że ta cyklaza może uczestniczyć w regulacji fototaksji u sinic.

Głodzenie azotowe a cAMP. U sinic poziom cAMP zazwyczaj ulega zwiększeniu w reakcji na głodzenie azotowe [35]. W doświadczeniach prowadzonych na typie dzikim i mutantach *cya⁻ Anabaena* 7120 wykazano, że taka reakcja zachodzi u typu dzikiego i mutantów z wyjątkiem mutanta *cyaC⁻*, u którego zmiana poziomu tego nukleotydu była znacznie mniejsza [45]. U transformantów tej sinicy (wprowadzono gen AC *Anabaena cylindrica* i bakteryjny promotor tac), u których poziom cAMP uległ znacznemu zwiększeniu (170 razy) nie obserwowano wpływu dostępności azotu na zawartość tego nukleotydu [45]. Badania prowadzone na *Anabaena variabilis* wykazały, że podwyższenie poziomu cAMP podczas głodzenia azotowego może być związane z obniżeniem aktywności fosfodiesterazy cAMP [74].

Symbioza sinic z roślinami. Sinice mogą tworzyć symbiotyczne asocjacje z różnymi *Eukaryota* (roślinami, grzybami, gąbkami i pierwotniakami). Symbiontami są zazwyczaj nitkowate sinice z rodzaju *Nostoc* zdolne do wiązania N_2. O zaangażowaniu szlaku cAMP w tworzeniu symbiozy sinicy z rośliną świadczą badania tego procesu u *Nostoc punctiforme*, która wchodzi w symbiozę z *Blasia pusilla*. Mutacja genu cyklazy adenylanowej (CyaC) sinicy w domenie katalitycznej zwiększa symbiotyczną kompetencję, natomiast uszkodzenie części N-terminalnej zmniejszało infekcyjność [21].

Stres solny. U sinic szlak cAMP może uczestniczyć w reakcji na stres solny poprzez wpływ NaCl na aktywność cyklaz adenylanowych, co wykazano w badaniach prowadzonych na *Anabaena* PCC 7120. U tej sinicy aktywność CyaB1 i CyaB2 jest allosterycznie regulowana przez wiązanie cAMP (odpowiednio, jedną lub dwie cząsteczki) z domenami GAF. Te domeny na zasadzie pozytywnego sprzężenia zwrotnego uczestniczą w regulacji aktywności tych enzymów w reakcji na CO_2 [12, 28, 59]. Jony Na^+ specyficznie hamują aktywność obu cyklaz ponieważ wiążą się z domeną GAF, zmieniają konformację tandemu tych domen i osłabiają pozytywną autoregulację przez niskie stężenia cAMP (< 1 μM) [18]. Doświadczalnie wykazano, że wysokie stężenie Na^+ (4 mM) specyficznie hamuje autoregulację CyaB1 i CyaB2 przez cAMP, natomiast obniżenie stężenia tych jonów (0,2 mM) uwalnia Na^+ z GAF i przywraca autoregulację syntezy cAMP.

Wzrost komórek sinic a cAMP. O wpływie szlaku cAMP na wzrost komórek sinic wiadomo niewiele. Pomiary rozmiarów komórek formy dzikiej i mutantów *cya⁻ Anabaena* 7120 wykazały, że komórki mutantów *cyaB2⁻* i *cyaB⁻* były nieco mniejsze, natomiast komórki mutantów *CyaD⁻* były większe niż u typu dzikiego, poza tym komórki mutanta *CyaD⁻* po trzech tygodniach hodowli stawały się żółte [45]. Po wielokrotnym podwyższeniu zawartości cAMP u tej sinicy, uzyskanym dzięki wprowadzeniu do *Anabaena* 7120 genu AC z *Anabaena cylindrica*, stwierdzono fragmentację nici i hamowanie wzrostu w warunkach wiązania N_2 [45].

Przytoczone przykłady przemawiają za zaangażowaniem cAMP w procesy fizjologiczne i morfogenetyczne u sinic. Dalszych dowodów dostarczyły badania roli tego wtórnego przekaźnika w regulacji ekspresji genów. Analiza zsekwencjonowanych genomów sinic wykazała, że liczne geny zawierają w promotorach sekwencję wiążącą CRP, który jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez wiązanie cAMP [98]. Sekwencje takie mają geny związane z fotosyntezą, asymilacją azotu, geny przenośników i poryn, geny kinaz i dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału oraz geny o nieznanej jeszcze funkcji [98].

3.2. Regulacja transkrypcji u sinic przez szlak cAMP

Analiza zsekwencjonowanych genomów sinic umożliwiła identyfikację składników szlaku sygnalizacyjnego cAMP. Zidentyfikowano m.in. geny AC, PDE, oraz geny CRP i geny, których transkrypcja jest regulowana przez CRP.

Zaangażowanie szlaku sygnalizacyjnego cAMP w regulację ekspresji genów opisano u *Prokaryota* i u *Eukaryota*. U *Eukaryota* podwyższenie poziomu cAMP w komórkach aktywuje kinazę cAMP-zależną (PKA, *cAMP-dependent protein kinase*), która fosforyluje m.in. czynniki transkrypcyjne z rodziny CREB (m.in. CREB, *cyclic AMP-responsive element binding protein*; CREM, *cAMP-responsive element modulator*) i ICER, *inducible cyclic AMP early repressor*) wiążące się z sekwencją CRE (*cAMP response element*) promotora [19]. U *Prokariota* cAMP wiąże się i bezpośrednio aktywuje czynnik transkrypcyjny, białko CRP (*cAMP receptor protein*), które znane jest też, jako białko regulatora katabolicznego CAP (*catabolite gene activator protein*). CRP jest czynnikiem transkrypcyjnym obecnym powszechnie u różnych grup bakterii [9, 50, 107]. Wykazano, że u bakterii czynnik ten uczestniczy w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w różne procesy biologiczne, m.in. w asymilację organicznego węgla i przemiany energetyczne [11, 95], podziały komórek [92], produkcję toksyn [50], kompetencję rozwojową [20], wrażliwość i tworzenie *quorum sensing* [55].

CRP należy do nadrodziny czynników transkrypcyjnych CRP/FNR (TF) [52], które są regulatorami

transkrypcji powszechnie działającymi u eubakterii [57]. TF zawierają N-terminalną domenę efektorową i C-terminalną domenę wiązania z DNA (DBD, *DNA binding domain*) typu HTH (*helix-turn-helix*) [62]. TF tej nadrodziny tworzą *in vivo* homodimer, który jest aktywowany przez wiązanie specyficznych małych cząsteczek efektorowych przez domenę efektorową [62]. Dimery CRP są aktywowane po związaniu dwóch cząsteczek cAMP przez każdą podjednostkę. Przyłączenie cAMP powoduje zmianę konformacyjną DBD, co warunkuje wiązanie CRP ze specyficzną sekwencją DNA w promotorze genów docelowych [30] i oddziaływanie z C-terminalną domeną podjednostki α polimerazy RNA i jej wiązanie z promotorem [13, 37, 54, 63, 88].

Badania zsekwencjonowanych genomów *E. coli* i innych heterotroficznych bakterii wskazują, że ich genomy zawierają jedną kopię genu *crp* [10]. CRP u *E. coli* kontroluje ekspresję ponad 200 jednostek transkrypcyjnych [79, 80]. U tej bakterii CRP wiąże się z pseudo-palindromową sekwencją najwyższej zgodności TGTGAN$_6$TCACA [79], chociaż ostatnio u *E. coli* i innych γ-proteobacterii zidentyfikowano nieco inne miejsce wiązania CRP z sekwencją konsensus TGCGAN$_6$TCGCA [15]. Główna funkcja CRP u *E. coli* jest związana z transkrypcyjną regulacją genów uczestniczących w asymilacji organicznego węgla i przemianach energetycznych [95, 107].

Sinice są fotoautotrofami, a część gatunków jest zdolna do wykorzystywania N_2, jako źródła azotu, dlatego u tych organizmów nie dziwi zaangażowanie szlaku cAMP w regulację innych genów niż u *E. coli*. U ponad połowy zsekwencjonowanych genomów sinic zidentyfikowano, co najmniej jeden gen *crp*. Eksperymentalnie białka CRP badano m.in. u *Synechocystis* sp. PCC 6803 [8, 64, 73, 103] i *Anabaena* sp. PCC 7120 [86, 87]. W genomie *Synechocystis* sp. PCC 6803 zidentyfikowano ORF (*open reading frame*) genu *sll1371*, który koduje homolog produktu genu *crp E.* coli i który nazwano *sycrp1* [65]. Wykazano też, że SyCRP1 tworzy homodimer wiążący z dużym powinowactwem cAMP [102] i w obecności cAMP, podobnie jak u *E. coli*, tworzy kompleks z sekwencją DNA (TGTGAN$_6$TCACA) [102]. Wykazano, że SyCRP1 u tej sinicy pełni ważną rolę w biogenezie pilus typu IV i uczestniczy w regulacji ruchu komórek [8, 101, 104]. W genomie *Anabaena* sp. PCC 7120 zidentyfikowano dwie ORF (*alr0295* i *alr2325*), które kodują CRP (odpowiednio, *ancrpA* i *ancrpB*) [87]. Produkty tych genów (AnCRPA i AnCRPB) wiążą cAMP, a stosując EMSA (*electrophoresis mobility shift assay*) wykazano, że AnCrpA może wiązać się z miejscem wiązania CRP u *E. coli* [87]. Stwierdzono, że AnCrpA i AnCrpB u *Anabaena* sp. PCC 7120 regulują, odpowiednio, ekspresję kilku genów uczestniczących w wiązaniu azotu [86] i kontrolują ekspresję genów indukowanych przez brak azotu [33].

X u i Su [98], stosując wysoce precyzyjny algorytm skanowania, przeprowadzili analizę 29 zsekwencjonowanych genomów sinic (gatunków i ich szczepów) wykorzystując bazę danych NCBI ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria. Autorzy ci zidentyfikowali obecność genów *crp*, które kodują aktywowany przez cAMP czynnik transkrypcyjny CRP oraz TU (*transcription unit*; operony wielo- i jednogenowe) zawierające w promotorach sekwencję wiązania CRP z DNA. Brak genów *crp* wskazywałby, że szlak cAMP/CRP nie jest wykorzystywany w regulacji aktywności transkrypcyjnej u danego organizmu. W 29 przeanalizowanych genomach sinic geny *crp*, które są ortologami SyCRP1 (*sll1371*) *Synechocystis* sp. PCC 6803, zidentyfikowano tylko w 12 genomach, a mianowicie: *Acaryochloris marina* MBIC11017, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Prochlorococcus marinus* MIT 9313 i MIT9303, *Synechococcus* sp. CC9311, CC9605, JA-2-3B'a(2-13) i JA-3-3Ab, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 oraz *Trichodesmium erythraeum* IMS101. W większości genomów obecny był jeden homolog genu *crp*, a po dwa geny *crp* mają genomy *Synechocystis* sp. PCC 6803 [(*sll1371* i *sll1924* (SyCRP2)] i *Anabaena* sp. PCC 7120 [*alr0295* (AnCRPA) i *alr2325* (AnCRPB)]. Analiza genomów przeprowadzona przez X u i S u [98] nie wykazała obecności genów *crp* w 17 genomach sinic, tj. u *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Prochlorococcus marinus* u szczepów: AS9601, MIT 9211, MIT 9215, MIT 9301, MIT 9515, NATL1A, NATL2A, MIT9312, CCMP1375 i MED4, u *Synechococcus elongatus* PCC 6301 i PCC 7942 oraz u *Synechocystis* sp. CC9902, RCC307, WH 7803 i WH8102.

Omówione analizy wskazują, że genomy, które mają gen kodujący CRP mają też geny zawierające w promotorach miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego CPR. Liczba tych miejsc była różna i wahała się od 29 u *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (zawierającego 1075 TU) do 249 u *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (zawierającego 3300 TU) (Tabela II). W większości przypadków były one charakterystyczne dla gatunku i szczepu, a niewielka ich liczba była obecna w więcej niż dwóch genomach.

Analiza porównawcza genomu *E. coli* K12, u której CRP kontroluje ponad 200 TU i który zawiera 288 eksperymentalnie potwierdzonych miejsc wiązania CRP [107] z genomami sinic, wskazuje na obecność 13,88~32,19% wspólnych genów. Sugeruje to, że CRP u sinic ewolucyjnie zaadaptowały się do regulacji aktywności innej grupy genów niż u *E. coli*. Ogólnie, u *E. coli* i innych heterotroficznych bakterii produkty genów aktywowanych przez CRP uczestniczą przede wszystkim w asymilacji organicznego węgla i w metabolizmie energetycznym [95, 107], natomiast u sinic uczestniczą w regulacji procesów związanych z autotroficznym

Tabela II

Liczba miejsc wiązania CRP w genomach sinic zawierających gen kodujący CRP oraz geny regulowane przez CRP uczestniczące w różnych procesach biologicznych [wg 98]

Genom	Liczba miejsc wiązania CRP	Footosynteza	Metabolizm węgla	Asymilacja azotu	Przenośniki /poryny	Kinazy	Czynniki transkrypcyjne
Acaryochloris marina MBIC11017	174	*AM1_1272* *AM1_1560* *AM1_0526*	*AM1_2193* *AM1_2114*	*AM1_2462* *AM1_5490* *AM1_0481*	*AM1_1165* *AM1_6038* *AM1_0773* *AM1_2986* *AM1_3534* *AM1_4901* *AM1_2335*	*AM1_5208* *AM1_5107* *AM1_2792* *AM1_5169*	*AM1_3844* *AM1_4185* *AM1_5140* *AM1_0632*
Anabaena variabilis ATCC 29413	211	*Ava_4451* *Ava_3710* *Ava_0640*	*Ava_1491*	*Ava_4669*	*Ava_0687* *Ava_4995* *Ava_1172* *Ava_0874*	*Ava_4457* *Ava_0873* *Ava_0613* *Ava_4753* *Ava_1559* *Ava_3542* *Ava_1149* *Ava_3207* *Ava_3867* *Ava_4503* *Ava_3009*	*Ava_3703* *Ava_1629* *Ava_2629* *Ava_1558* *Ava_1021*
Synechococcus sp. JA-3-3Ab (A-Prime)	41	*CYA_0295*			*CYA_2315*		
Synechococcus sp. JA-2-3B'a(2–13) (B-Prime)	44	*CYB_2824*				*CYB_0465* *CYB_2795*	
Anabaena sp. PCC 7120	249	*asr0847* *alr0317* *alr0318* *alr0523* *alr0524* *alr0525*	*alr0169*	*alr0874* *all3335* *all3334* *all3333* *all3332*	*alr2210 alr2211* *alr2212 alr2213* *alr2118 alr2119* *asr2220* *all3335* *alr3938*	*all0853* *alr3037* *alr1192* *all1191* *all3207* *alr0428* *all4668* *alr1665* *alr3268* *alr2137* *all0323* *all3767* *all2883*	*alr1044* *all0187* *all2962* *alr1941*

Tabela II sc.d

Genom	Liczba miejsc wiązania CRP	Footosynteza	Metabolizm węgla	Asymilacja azotu	Przenośniki /poryny	Kinazy	Czynniki transkrypcyjne
Prochlorococcus marinus str. MIT 9313	63	*PMT1665*			*PMT2110* *PMT1524*	*PMT0265* *PMT0845*	*PMT0986*
Prochlorococcus marinus MIT9303	55	*P9303_22121* *P9303_22711*			*P9303_04171*		*P9303_17661* *P9303_11401*
Synechococcus sp. CC9311	34				*sync_0219*		
Synechococcus sp. CC9605	90	*Syncc9605_1640* *Syncc9605_0485*		*Syncc9605_1575* *Syncc9605_2642*		*Syncc9605_2284*	
Synechocystis sp. PCC 6803	59	*sll1577 sll1578* *sll1579 sll1580* *ssl3093* *sll0634* *slr1739* *sll1874 sll1875* *slr1459* *slr1838 slr1839* slr1838	*sll1709* *slr2082* *slr2083* *ssl2153* *sll0084* *slr1349* *slr1350*		*slr1392* *sll0537* *sll0240* *slr1452 slr1453* *slr1454* *slr1455 slr1457* *slr1453* *slr1488* sll0273 slr1950	*slr1400* *slr1805* *slr0484*	*sll1708* *sll1371* *slr1489*
Trichodesmium erythraeum IMS101	132	*Tery_4669*			*Tery_2879* *Tery_1324* *Tery_4986* *Tery_3858* *Tery_0199* *Tery_2779*	*Tery_1627* *Tery_3423* *Tery_2051* *Tery_4912*	*Tery_1557*
Thermosynechococcus elongatus BP-1	29	*tsr0033*	*tlr1171*	*tll0330* *tlr2000* *tlr2001* *tlr2002* *tlr2003*	*tll0559* *tlr0335* *tlr2000 tlr2001* *tlr2002* *tlr2003*		*tll0328*

odżywianiem, adaptacją do warunków środowiska, wiązaniem N_2 oraz innymi procesami, przy czym u poszczególnych gatunków i szczepów są to często różne geny regulowane przez CRP.

W Tabeli II zestawiono geny, których promotory zawierają miejsca wiązania CRP sklasyfikowane przez Xu i Su [98] według pełnionej funkcji. Poniżej podano też ich omówienie częściowo korzystając z komentarzy tych autorów.

Geny związane z fotosyntezą. Jak wspomniano powyżej, u sinic światło wpływa na poziom cAMP w komórkach [69], a zmiana poziomu tego wtórnego przekaźnika może poprzez CRP wpływać na ekspresję genów związanych z fotosyntezą. Analiza genomów sinic zawierających geny *crp* wykazała, że liczba takich genów może być różna. W sumie zidentyfikowano 14 genów potencjalnie regulowanych przez CRP, które kodują białka centrum reakcji fotosystemów (w tym: *AM1_0526, asr0847, Ava_4451, Ava_0640, asr0847, CYA_0295, CYB_2824, PMT1665, P9303_22121, P9303_22711, Syncc9605_1640, sll0634, slr1739*, i *Tery_4669*); białka mechanizmu oceny koncentracji CO_2 (ccmK) (w tym *alr0317-0318* i *slr1838-slr1839*) i geny białek z rodziny fikobiloprotein (w tym *alr0523-0525, sll1577-1580, ssl3093, slr1459* i *tsr0033*) (Tabela II).

Geny asymilacji azotu. Sinice pobierają azot w postaci jonowej, a część gatunków jest zdolna do asymilacji N_2. W genomach *Acaryochloris marina* MBIC11017, *Anabaena variabilis* ATCC29413 i *Nostoc* sp. PCC7120 zidentyfikowano geny, odpowiednio, *AM1_2462, Ava_4669* i *alr0874*, których ekspresja jest regulowana przez CRP i które kodują białko nitrogenazo-podobne. U *Nostoc* sp. PCC7120 zidentyfikowano operon (*all3332-3335*) kodujący transporter azotanu, który zawiera miejsca wiązania CRP. Xu i Su [98] proponują następujący scenariusz reakcji u *Anabaena variabilis* na głodzenie azotowe. Głodzenie powoduje zwiększenie aktywności AC, co prowadzi do 3–4-krotnego zwiększenie poziomu cAMP w komórkach i aktywację CRP. Aktywacja CRP obniża poziom transkrypcji genów transporterów azotanu (*all3332-3335*), natomiast zwiększa ekspresję genów reduktazy nitrogenazy (*alr0874*) i nitogenazy (*AM1_2462, Ava_4669*) (Tabela II). Taka regulacja ekspresji genów ma na celu skuteczniejsze wykorzystanie energii dla wiązania gazowego azotu.

Geny przenośników i poryn. W genomach sinic zidentyfikowano niewiele genów kodujących przenośniki i poryny, których aktywność może być regulowana przez CRP, np. u *Nostoc* sp. PCC 7120 geny *alr2210-2213* i *alr2118-2120*, a u *Synechocystis* sp. PCC 6803 geny *slr1392* i *slr1950*. Poza tym w genomach różnych sinic zidentyfikowano geny regulowane przez CRP, np. CYA_2315, Ava_0687, sll0240, slr1452-1457, tll0559, których produkty są antyporterami i transporterami ABC (Tabela II).

Geny kinaz i dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału. U bakterii dwuskładnikowy system transdukcji sygnału, składający się kinazy histydynowej i regulatora odpowiedzi [40], odgrywa istotną rolę w adaptacji do zmian w środowisku. Istnieją też białka regulacyjne zawierające zarówno domenę sensorową i przekaźnikową oraz regulator odpowiedzi; są to tzw. hybrydowe kinazy sensorowe (*hybrid sensory kinases*). Ich przykładem może być cyklaza CyaC, której cząsteczka zawiera domeny „hybrydowej kinazy sensorowej" oraz domenę katalityczną [42]. Oba elementy dwuskładnikowego systemu regulacyjnego tworzą liczne rodziny białek. Ten system odgrywa istotną rolę w reakcjach sinic na zmiany warunków środowiska, a liczne geny zaangażowane w jego funkcjonowanie regulowane przez CRP świadczą o tym, że przynajmniej u gatunków i szczepów zawierających w genomach gen *crp*, regulacja dwuskładnikowego systemu zachodzi z udziałem cAMP (Tabela II). Jest interesujące, że chociaż u *Synechocystis* sp. PCC 6803 CRP uczestniczy w fototaksji, na co wskazuje wyraźne jej osłabienie u mutantów *sycrp1* i AC [8, 101], to nie udało się wykazać, że geny uczestniczące w transdukcji sygnału dla tworzenia pilus i fototaksji [101] są regulowane przez CRP.

Inne geny. W genomach sinic zawierających gen *cre* zidentyfikowano też liczne geny zawierające miejsce wiązania CRP, które stwierdzono u niektórych gatunków czy szczepów oraz geny o nieznanej jeszcze funkcji [98].

Wśród przeanalizowanych 29 genomów sinic stwierdzono, że 17 genomów może nie mieć genu kodującego CRP, co wskazuje, że te organizmy mogą funkcjonować bez regulacji genów przez ten czynnik transkrypcyjny i że szlak sygnalizacyjny cAMP/CRP nie jest uniwersalnym systemem uczestniczącym w regulacji transkrypcji u sinic. Zwraca też uwagę fakt, że geny regulowane przez CRP u sinic pełnią raczej inną rolę niż u *E. coli*, zaś u sinic oprócz genów zaangażowanych w analogiczną funkcję, u poszczególnych gatunków/szczepów CRP może regulować aktywność genów związanych z innymi procesami.

Nie można wykluczyć, chociaż nie ma danych potwierdzających taką możliwość, że u sinic cAMP może uczestniczyć w regulacji aktywności transkrypcyjnej nie poprzez CRP i że taką rolę mogą pełnić inne TF. Poszukując ewolucyjnego wyjaśnienia obecności i braku genów *crp* w zsekwencjonowanych genomach sinic Xu i Su [98] dla badanych gatunków/szczepów sinic skonstruowali drzewo filogenetyczne w oparciu o sekwencję 16S rRNA. Okazało się, że genomy zawierające gen *crp* nie tworzą monofiletycznej grupy, że genomy z genami kodującymi CRP są rozproszone w tym drzewie. Autorzy sądzą, że w czasie adaptacji do odpowiednich warunków środowiskowych mogła nastąpić ewolucyjna utrata genów *crp*, szczególnie u morskich sinic. Przeprowadzona przez Xu i Su [98] analiza dystrybucji

nadrodziny CRP/FNR we wszystkich 29 badanych genomach wykazała, że we wszystkich genomach jest przynajmniej jeden gen kodujący białko z tej nadrodziny i sądzą, że jest prawdopodobne, że mogą one rozpoznawać CRP-podobne miejsca wiązania z DNA.

4. Podsumowanie

Szlak cAMP jest powszechnie funkcjonującym wtórnym szlakiem sygnalizacyjnym u *Prokaryota* i u *Eukaryota*. Na udział tego szlaku w regulacji przebiegu różnych procesów metabolicznych w komórkach sinic wskazuje wykrycie cAMP w komórkach tych organizmów, wyraźna reakcja ich komórek obserwowana po stosowaniu egzogennego cAMP i zmiana jego poziomu w komórkach zależnie od czynników środowiskowych. U sinic wykazano obecność enzymów syntezy oraz degradacji cAMP (odpowiednio, AC i PDE) oraz zidentyfikowano geny kodujące białka zaangażowane w szlak transdukcji sygnału przez cAMP. Obecnie znana jest sekwencja 29 całych genomów różnych gatunków sinic (i ich szczepów), w których zidentyfikowano geny AC i PDE, geny akceptorów cAMP (CRP), które są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez ten nukleotyd oraz geny, które w promotorach mają sekwencję wiązania CRP. Zidentyfikowano też geny kodujące białka pełniące ważną rolę w przebiegu różnych procesów fizjologicznych, m.in. białka związane z fotosyntezą, metabolizmem węgla, asymilacją azotu, białka przenośników i poryn, kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych.

Dotychczasowe badania szlaku sygnalizacyjnego cAMP u sinic mogą wskazywać, że nie jest on uniwersalnym szlakiem regulacji funkcjonowania komórek sinic. Istnieje jednak możliwość, że genomy sinic, u których nie stwierdzono obecności genów AC, PDE, genów kodujących CRP i genów, których aktywność jest regulowana przez CRP, mogą zawierać zmodyfikowane, jeszcze niezidentyfikowane sekwencje kodujące poszczególne elementy szlaku cAMP.

Szlak sygnalizacyjny cAMP u sinic ma prostszy, prawdopodobnie bardziej pierwotny przebieg niż u ssaków, chociaż kluczowe jego elementy są obecne i u *Eukaryota* i u sinic. Różnice w organizacji szlaku cAMP u sinic i ssaków, u których jest on najlepiej poznanym wtórnym szlakiem sygnalizacyjnym i uczestniczy w regulacji licznych fundamentalnych procesów fizjologicznych, mogą wynikać z prokariotycznej budowy komórek sinic, a co za tym idzie z braku tkankowo-organowego zróżnicowania struktury i funkcji komórek sinic. U ssaków efektywność i specyficzność regulacyjna szlaku sygnalizacyjnego cAMP z jednej strony wynika z tkankowo-zależnej ekspresji różnych heterotrimerowych białek G, różnych izoform tmAC i PDE oraz z obecności różnych PKA w komórkach, z drugiej zaś strony z kompartymentacji tego szlaku w komórkach, ponieważ PKA będąca istotnym efektorem cAMP, może być związana z AKAP (*A-kinase-anchoring proteins*), które są zlokalizowane na różnych organellach komórkowych. U ssaków aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny CREB zachodzi poprzez aktywację PKA przez cAMP, natomiast u sinic czynnik transkrypcyjny (CRP) jest aktywowany bezpośrednio przez wiązanie cAMP.

Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Prof. dr hab. Adamowi Jaworskiemu za cenne merytoryczne i redakcyjne uwagi pomocne w przygotowaniu niniejszego artykułu, oraz Panu Prof. nadzw. dr hab. Tomaszowi Sakowiczowi za krytyczne uwagi dotyczące manuskryptu.

Piśmiennictwo

1. Amrhein N.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases in plants. *Z. Pflanzenphysiol.* **72**, 249–261 (1974)
2. Ashby M.K., Houmard J.: Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 472–509 (2006)
3. Bai G., Knapp G.S., McDonough K.A.: Cyclic AMP signalling in mycobacteria: redirecting the conversation with a common currency. *Cell Microbiol.* **13**, 349–358 (2011)
4. Baker D.A., Kelly J.M.: Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol. Microbiol.* **52**, 1229–1242 (2004)
5. Barzu O., Danchin A.. Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **49**: 241–283 (1994)
6. Beavo J.A.: Cyclic nucleocide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* **75**: 725–748 (1995)
7. Beavo J.A., Brunton,L.L.: Cyclic nucleotide research-still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 710–718 (2002)
8. Bhaya D., Nakasugi K., Fazeli F., Burriesci M.S.: Phototaxis and impaired motility in adenylyl cyclase and cyclase receptor protein mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **188**, 7306–7310 (2006)
9. Błaszczyk U.: Białko wiążące cykliczny AMP z *Escherichia coli* – globalny regulator transkrypcji. *Post. Mikrobiol.* **47**, 127–135 (2008)
10. Botsford J.L., Harman J.G.: Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**, 100–122 (1992)
11. Bott M.: Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch. Microbiol.* **167**, 78–88 (1997)
12. Bruder S., Linder J.U., Martinez S.E., Zheng N., Beavo J.A., Schultz J.E.: The cyanobacterial tandem GAF domains from the cyaB2 adenylyl cyclase signal via both cAMP-binding sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **102**, 3088–3092 (2005)
13. Busby S., Ebright R.H.: Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199–213 (1999)
14. Cadoret J.C., Rousseau B., Perewoska I., Sicora C., Cheregi O., Vass I., Houmard J.: Cyclic nucleotides, the photosynthetic apparatus and response to a UV-B stress in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **280**, 33935–33944 (2005)

15. Cameron A.D., Redfield R.J.: Non-canonical CRP sites control competence regulons in *Escherichia coli* and many other gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6001–6014 (2006)
16. Cann M. J.: Signalling through cyclic nucleotide monophospahtes in cyanobacteria. *New Phytol.* **161**, 23–34 (2003)
17. Cann M.J., Hammer A., Zhou J., Kanacher T.: A defined subset of adenylyl cyclases is regulated by bicarbonate ion. *J. Biol. Chem.* **278**, 35033–35038 (2003)
18. Cann M.J.: Sodium regulation of GAF domain function. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1032–1034 (2007)
19. Cesare D., De Fimiaa G.M., Sassone-Corsi P.: Signalling routes to CREM and CREB. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 281–285 (1999)
20. Chandler M.S.: The gene encoding cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1626–1630 (1992)
21. Chapman K.E., Duggan P.S., Billington N.A., Adams D.G.: Mutation at different sites in the *Nostoc punctiforme* cyaC gene, encoding the multiple-domain enzyme adenylate cyclase, results in different levels of infection of the host plant *Blasia pusilla*. *J. Bacteriol.* **190**, 1843–1847 (2008)
22. Chen Y., Cann M.J., Litvin T.N., Iourgenko V., Sinclair M.L., Levin L.R., Buck J.: Soluble adenylyl cyclase as an evolutionary conserved bicarbonate sensor. *Science*, **289**, 625–628 (2000)
23. Cotta M.A., Whitehead T.R., Wheeler M.B.: Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 257–260 (1998)
24. Danchin A.: Phylogeny of adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **27**, 109–162 (1993)
25. Francko D., Wetzel R.: Dynamics of cellular and extracelular cAMP in *Anabaena flos-aquae* (Cyanophyta): Intrinsic culture variability and correlation with metabolic variables. *J. Phycol.* **17**, 129–134 (1981)
26. Franco,D.A., Wetzel,R.G.: Cyclic AMP production and extracellular release from green and blue-green alga. *Physiol. Plant.* **49**, 65–67 (1980)
27. Fujisawa T., Ohmori M.: Biochemical properties of a cAMP phosphodiesterase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbes Environ.* **20**, 92–95 (2005)
28. Hammer A., Hodgson D.R.W., Cann M.J.: Regulation of prokaryotic adenylyl cyclases by CO_2. *Biochem. J.* **396**, 215–218 (2006)
29. Hantke, K., Winkler,K., Schultz J.E.: Escherichia coli exports cyclic AMP via TolC. *J. Bacteriol.* **193**, 1086–1089 (2011)
30. Harman J.G.: Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1547**, 1–17 (2001)
31. Herdman M., Elmorjani K.: Cyclic nucleotides. *Methods Enzymol.* **167**, 584–591 (1988)
32. Higo A., Ikeuchi M., Ohmori M.: cAMP regulates respiration and oxidative stress during rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.* **582**, 1883–1888 (2008)
33. Higo A., Suzuki T., Ikeuchi M., Ohmori M.: Dynamic transcriptional changes in response to rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*, **153**, 3685–3694 (2007)
34. Hintermann R., Parish R.W.: Determination of adenylate cyclase activity in a variety of organisms: evidence against the occurence of the enzyme in higher plants. *Planta*, **146**, 459–461 (1979)
35. Hood E.E., Armour S., Ownby J.D., Handa A.K., Bressan R.A.: Effect of nitrogen starvation on the level of adenosine 3',5'-monophosphate in *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **588**, 193–200 (1979)
36. Hughes J., Lamparter T., Mittmann F., Hartmann E., Gartner W., Wilde A., Borner T.: A prokaryotic phytochrome. *Nature*, 386, **663** (1997)
37. Igarashi K., Ishihama A.: Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell*, **65**, 1015–1022 (1991)
38. Imashimizu M., Yoshimura H., Katoh H., Ehira S., Ohmori M.: NaCl enhances cellular cAMP and upregulates genes related to heterocyst development in the cyanobacterium, *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**, 97–103 (2005)
39. Jaiswal B.S., Conti M.: Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10676–10681 (2003)
40. Juda M., Dadas E., Malm A.: Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii. *Post. Mikrobiol.* **45**, 237–247 (2007)
41. Kanacher T., Schultz A., Linder J.U., Schultz J.E.: A GAF--domain regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self--activating cAMP switch. *EMBO J.* **21**, 3672–3680 (2002)
42. Kasahara M., Ohmori M.: Activation of a cyanobacterial adenylate cyclase, CyaC, by autophosphorylation and a subsequent phosphotransfer reaction. *J. Biol. Chem.* **274**, 15167–15172 (1999)
43. Kasahara M., Unno T., Yashiro K., Ohmori M.: CyaG, a novel cyanobacterial adenylyl cyclase and a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **276**, 10564–10569 (2001)
44. Kasahara M., Yashiro K., Sakamoto T., Ohmori M.: The *Spirulina platensis* adenylate cyclase gene, cyaC, encodes a novel signal transduction protein. *Plant Cell Physiol.* **38**, 828–836. (1997)
45. Katayama M., Ohmori M.: Expression of adenylate cyclase gene of *Anabeana cylindrica* in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Cell Physiol.* **39**, 786–789 (1998)
46. Katayama M., Ohmori M.: Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **179**, 3588–3593 (1997)
47. Katayama M., Wada Y., Ohmori M.: Molecular cloning of the cyanobacterial adenylate cyclase gene from the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* **177**, 3873–3878 (1995)
48. Kaupp U.B., Seiferr R.: Cyclic nucleotide-gated channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769–824 (2002)
49. Kehoe D.M., Grossman A.R.: Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors, *Science*, **273**, 1409–1412 (1996)
50. Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., Adhya S.: Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749–795 (1993)
51. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M.: Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3160–3165 (2004)
52. Korner H., Sofia H.J., Zumft W.G.: Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 559–592 (2003)
53. Kumar H.D., Gupta M.: Effects of cyclic nucleotides on morphogenesis in *Nostoc muscorum*. *Archiv. Microbiol.* **119**, 183–186 (1978)
54. Lee T.W., Won H.S., Park S.H., Kyogoku Y., Lee B.J.: Detection of the protein-protein interaction between cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase, by (13)C-carbonyl NMR. *J. Biochem.* **130**, 57–61 (2001)
55. Liang W., Pascual-Montano A., Silva A.J., Benitez J.A.: The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, **153**, 2964–2975 (2007)

56. Lohmann S.M., Vaandrager A.B., Smolenski A., Walter U., De Jonge H.R.: Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 307–312 (1997)
57. Madan Babu M., Teichmann S.A., Aravind L.: Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks. *J. Mol. Biol.* **358**, 614–633 (2006)
58. Mamenko M.V., Chizhmakov I.V., Volkova T.M., VerkhratskyA., Krishtal O.A.: Extracellular cAMP inhibits P2X(3) receptors in rat sensory neurones through G protein-mediated mechanism. *Acta Physiol.* **199**, 199–204 (2010)
59. Martinez S.E., Bruder S., Schultz A., Zheng N., Schultz J.E., Beavo J.A., Linder J.U.: Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3082–3087 (2005)
60. Masuda S., Ono T.A.: Adenylyl cyclase activity of Cya1 from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is inhibited by bicarbonate. *J. Bacteriol.* **187**, 005032–5035 (2005)
61. Masuda S., Ono T.A.: Biochemical characterization of the major adenylyl cyclase, Cya1, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*. **577**, 255–258 (2004)
62. McKay D.B., Steitz T.A.: Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 A resolution suggests binding to left-handed BDNA. *Nature*, **290**, 744–749 (1981)
63. Niu W., Kim Y., Tau G., Heyduk T., Ebright R.H.: Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell*, **87**, 1123–1134 (1996)
64. Ochoa De Alda J.A., Ajlani G., Houmard J.: Synechocystis strain PCC 6803 cya2, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. *J. Bacteriol.* **182**, 3839–3842 (2000a)
65. Ochoa de Alda J.A., Houmard J.: Genomic survey of cAMP and cGMP signalling components in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Microbiology*, **146**, 3183–3194 (2000b)
66. Ogawa T., Terui G.: Studies on the growth of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.* **48**, 361–367 (1970)
67. Ohmori K., Hirose M., Ohmori M.: An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* **34**, 169–171 (1993)
68. Ohmori M., Ikeuchi M., Sato N., Wolk P., Kaneko T., Ogawa T., Kanehisa M., Goto S., Kawashima S., Okamoto S., Yoshimura H., Katoh H., Fujisawa T., Ehira S., Kamei A., Yoshihara S., Narikawa R., Tabat S.: Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing *Cyanobacterium anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**, 271–284 (2001)
69. Ohmori M., Ohmori K., Hasunuma K.: Rapid change in cyclic--3',5'-AMP concentration triggered by a light-off or light-on signal in *Anabaena cylindrica*. *Archiv. Microbiol.* **150**, 203–204 (1988)
70. Ohmori M., Okamoto S.: Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 503–511 (2004)
71. Ohmori M., Terauchi K., Okamoto S., Watanabe M.: Regulation of cAMP-mediated photosignaling by a phytochrome in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Photochem. Photobiol.* **75**, 675–679 (2002)
72. Okamoto S., Kasahara M., Kamiya A., Nakahira Y., Ohmori M.: A phytochrome-like protein AphC triggers the cAMP signaling induced by far-red light in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Photochem. Photobiol.* **80**, 429–433 (2004)
73. Omagari K., Yoshimura H., Takano M., Hao D., Ohmori M., Sarai A., Suyama A.: Systematic single base-pair substitution analysis of DNA binding by the cAMP receptor protein in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **563**, 55–58 (2004)
74. Ownby J.D., Kuenzi F.E.:. Changes in cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Anabaena variabilis* during growth and nitrogen starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 243–247 (1982)
75. Patel T.B., Du Z., Pierre S., Cartin L., Scholich K. : Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene*, **269**, 13–25 (2001)
76. Rich T.C., Karpen J.W.: Review article: Cyclic AMP sensors in living cells: What signals can they actually measure? *Ann. Biomed. Eng.* **30**, 1088–1099 (2002)
77. Ritchie A.V., Vanes S., Fouquet C., Schaap P.: From drought sensing to developmental control: Evolution of cyclic AMP signaling in social amoebas. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 2109–2118 (2008)
78. Sakamoto T., Murata N., Ohmori M.: The concentration of cyclic AMP and adenylate cyclase activity in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **32**, 581–584 (1991)
79. Salgado H., Gama-Castro S., Martinez-Antonio A., Diaz-Peredo E., Sanchez-Solano F., Peralta-Gil M., Garcia-Alonso D., Jimenez-Jacinto V., Santos-Zavaleta A., Bonavides-Martinez C. i wsp.: Regulon DB (version 4.0): transcriptional regulation, operon organization and growth conditions in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* D303–306 (2004)
80. Salgado H., Santos-Zavaleta A., Gama-Castro S., Peralta-Gil M., Penaloza-Spinola M.I., Martinez-Antonio A., Karp P.D., Collado-Vides J.: The comprehensive updated regulatory network of *Escherichia coli* K-12. *BMC Bioinformatics*, **7**, 5 (2006)
81. Shenoy A.R., Visweswariah S.S.: Mycobacterial adenylyl cyclases: biochemical diversity and structural plasticity. *FEBS Lett.* **580**, 3344–3352 (2006)
82. Shenroy A.R., Visweswariah S.S.: Class III nucleotide cyclases in bacteria and archaebacteria: lineage-specific expansion of adenylyl cyclases and a dearth of guanylyl cyclases. *FEBS Lett*. **561**, 11–21 (2004)
83. Sismeiro O., Trotot P., Biville F., Vivares C., Danchin A.: *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaebacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 3339–3344 (1998)
84. Smith G., Ownby J.: Cyclic AMP interferes with pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS Microb. Lett.* **11**, 175–180 (1981)
85. Sunahara R.K., Beuve A., Tesmer J.J., Sprang S.R., Garbers D.L., Gilman A.G.: Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **273**, 16332–16338 (1998)
86. Suzuki T., Yoshimura H., Ehira S., Ikeuchi M., Ohmori M.: AnCrpA, a cAMP receptor protein, regulates nif-related gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 grown with nitrate. *FEBS Lett.* **581**, 21–28 (2007)
87. Suzuki T., Yoshimura H., Hisabori T., Ohmori M.: Two cAMP receptor proteins with different biochemical properties in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.* **571**, 154–160 (2004)
88. Tagami H., Aiba H.: A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. *EMBO J.* **17**, 1759–1767 (1998)
89. Tellez-Sosa J., Soberon N., Vega-Segura A., Torres-Marquez M.E., Cevallos M.A.: The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J. Bacteriol.* **184**, 3560–3568 (2002)
90. Terauchi K., Ohmori M.: An adenylate cyclase, Cya1, regulates cell motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **40**, 248–251 (1999)

91. Terauchi K., Ohmori M.: Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system. *Mol. Microbiol.* **51**, 567–577 (2004)
92. Utsumi R., Noda M., Kawamukai M., Komano T.: Control mechanism of the *Escherichia coli* K-12 cell cycle is triggered by the cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein complex. *J. Bacteriol.* **171**, 2909–2912 (1989)
93. Wang J.Y., Clegg D.O., Koshland D.E. Jr.: Molecular cloning and amplification of the adenylate cyclase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4684–4688 (1981)
94. Wedel B., Garbers D.: The guanylyl cyclase family at Y2K. *Ann. Rev. Physiol.* **63**, 215–233 (2001)
95. Weickert M.J., Adhya S.: The galactose regulon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**, 245–251 (1993)
96. Wu J., Bai J., Bao Q., Zhao F.: Lineage-specific domain fusion in the evolution of purine nucleotide cyclases in cyanobacteria. *J. Mol. Evol.* **67**, 85–94 (2008)
97. Wu J., Zhao F., Wang S., Deng G., Wang J., Bai J., Lu J., Qu J., Bao Q.: cTFbase: a database for comparative genomics of transcription factors in cyanobacteria. *BMC Genomics*, **8**, 104 (2007)
98. Xu M., Su Z.: Computational prediction of cAMP receptor protein (CRP) binding sites in cyanobacterial genomes. BMC Genomics, 10, 23; doi:10.1186/1471-2164-10-23 (2009)
99. Yashiro K., Sakamoto T., Ohmori M.: Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Mol. Biol.* **31**, 175–181 (1996)
100. Yeh K., Wu S., Murphy J.T., Lagarias J.C.: A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, **227**, 1505–1508 (1997)
101. Yoshihara S., Ikeuchi M.: Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci*, **3**, 512–518 (2004)
102. Yoshimura H., Hisabori T., Yanagisawa S., Ohmori M.: Identification and characterization of a novel cAMP receptor protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **275**, 6241–6245 (2000)
103. Yoshimura H., Yanagisawa S., Kanehisa M., Ohmori M.: Screening for the target gene of cyanobacterial cAMP receptor protein SYCRP1. *Mol. Microbiol.* **43**, 843–853 (2002a)
104. Yoshimura H., Yoshihara S., Okamoto S., Ikeuchi M., Ohmori M.: A cAMP receptor protein, SYCRP1, is responsible for the cell motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant. Cell. Physiol.* **43**, 460–463 (2002b)
105. Zhang X., Zhao F., Guan X., Yang Y., Liang C., Qin S.: Genomewide survey of putative serine/threonine protein kinases in cyanobacteria. *BMC Genomics*, **8**, 395 (2007)
106. Zhao F., Zhang X., Liang C., Wu J., Bao Q., Qin S.: Genome-wide analysis of restriction-modification system in unicellular and filamentous cyanobacteria. *Physiol. Genomics*, **24**, 181–190 (2006)
107. Zheng D., Constantinidou C., Hobman J.L., Minchin S.D.: Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5874–5893 (2004)
108. Zippin J.H., Levin L.R., Buck J.: CO_2/HCO_3-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 366–370 (2001)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 83–91
http://www.pm.microbiology.pl

PROMIENIOWCE – WYSTĘPOWANIE I WYTWARZANIE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH

Jolanta Solecka[1]*, Joanna Ziemska[1], Aleksandra Rajnisz[1], Anna Laskowska[1], Adam Guśpiel[1]

[1]Samodzielna Pracownia Związków Biologicznie Czynnych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. +48 22 542-14-23

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wstęp. 2. Bioaktywne metabolity promieniowców. 3. Miejsca występowania promieniowców. 4. Promieniowce bytujące w glebie. 5. Promieniowce w środowisku morskim. 6. Inne źródła. 7. Podsumowanie

Actinomycetes – occurrence and production of biologically active compounds

Abstract: Actinomycetes are prolific producers of many bioactive metabolites, including antibacterial, antifungal, antiviral or anticancer substances. They belong to Gram-positive bacteria and are isolated from different environments. Among actinomycetes, the *Streptomyces* genus plays a major role in productivity of metabolites with biological activity and is most widespread all over the world. From the beginning of golden era of antibiotics, actinomycetes metabolites were mainly isolated from the soil. As the obtaining the previously discovered metabolites from terrestrial habitats increases, there are attempts to look for new sources, e.g. seas, oceans, etc. Marine isolates are different from soil actinomycetes in their chemical structures, mode of action or biological activity. Marine sponges are especially rich in actinomycete strains. However, actinomycetes are also isolated from fallen leaves, ants' nests, deserts, Antarctica sediments and snow cores, caves or spider materials.

1. Introduction. 2. Bioactive metabolites from actinomycetes. 3. Actinomycetes in different environments. 4. Soil actinomycetes. 5. Actinomycetes in marine environment. 6. Other sources. 7. Summary

Słowa kluczowe: bioaktywne metabolity, gąbki, promieniowce, *Streptomyces*, źródła
Key words: bioactive metabolites, sponges, actinomycetes, *Streptomyces*, sources

1. Wstęp

Promieniowce (*Actinomycetes*) należą do bakterii Gram-dodatnich o nieregularnej, cylindrycznej budowie z tendencją do rozgałęziania się. Budowa ta upodabnia je do grzybów nitkowatych. Splątki nitek wrastające w podłoże tworzą pseudogrzybnię podstawową (substratową) i powietrzną. Promieniowce rozmnażają się przez podział (fragmentację) pseudogrzybni i wytwarzenie zarodników.

Nazwa *Actinomyces* została nadana przez niemieckiego botanika Carla Otto H a r z a w 1877 roku. Panowała wówczas powszechnie choroba bydła, zwana promienicą, powodująca zniekształcenie kości i obrzęki. Była ona wywołana przez promieniowce chorobotwórcze, *Actinomyces bovis*. W 1916 r. bakteriolog Robert E a r l e B u c h a n a n nadał nazwę rzędowi *Actinomycetales* [20]. Promieniowce należą do gromady XXVI (Phylum XXVI) *Actinobacteria* phyl. nov. W obrębie klasy I (Class I) *Actinobacteria* wyróżnia się 16 rzędów (Orders), 43 rodziny (Families) i 227 rodzajów (Genera) według Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [17]. Jednakże w literaturze opisywane są już inne, nowoodkryte rodzaje i należące do nich gatunki [40]. Promieniowce w porównaniu do innych bakterii charakteryzują się dużym genomem, a także wysoką zawartością G + C w DNA [49]. Zazwyczaj 5–10% genomu promieniowców, stanowią geny odpowiedzialne za wtórny metabolizm [3].

Promieniowce występują powszechnie w glebie, ale także w wodach słodkich i słonych, kompostach czy oborniku. Biorą udział w procesie rozkładu szczątków zwierzęcych i materiałów biologicznych, takich jak celuloza, chityna, lignina. Jest to możliwe dzięki wytwarzaniu przez te bakterie wielu enzymów: cellulaz, chitynaz, ksylanaz [20]. Ponadto, promieniowce są producentami enzymów biorących udział w lizie ścian komórkowych mikroorganizmów (bakterii i grzybów), np. lizozymu, hydrolaz peptydylo-peptydowych, glukanaz, mannanaz oraz chitynaz [49].

Niektóre z nich (np. promieniowce z rodzaju *Frankia*) wchodzą w symbiozę z roślinami wyższymi, wiążąc azot. Przekształcają również powstały w procesach rozkładu materii organicznej amoniak w azotany, które są łatwiej przyswajalną formą azotu dla korzeni roślin. Inne wiążą azot z powietrza, czyniąc go także bardziej dostępnym dla roślin [20].

Opisuje się również promieniowce produkujące wiele barwników (brązowych, czarnych) odpowiedzialnych za ciemny kolor humusu. Wytwarzają one także m.in. antybiotyki o fioletowym zabarwieniu, mederrodynę

* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Związków Biologicznie Czynnych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. +48 22 542-13-87; e-mail: jsolecka@pzh.gov.pl

(mederrhodin), niebieską aktynorodynę (actinorhodin), brązową medermycynę (medermycin) [20].

Autorytetem w dziedzinie hodowli omawianych drobnoustrojów był Selman Waksman, odkrywca streptomycyny i innych antybiotyków wytwarzanych przez te mikroorganizmy. Waksman, będąc studentem pobierał próbki gleby otaczającej uniwersytet w New Brunswick, na którym studiował. Następnie posiewał je na płytki z podłożem i obserwował wzrost mikroorganizmów. Szybko zaobserwował występowanie kolonii podobnych do bakteryjnych, ale pod mikroskopem przypominających grzyby. Kolonie te często wytwarzały barwniki. Ich ilość była różna w zależności od rodzaju gleby, jej pH, głębokości wydobycia i czy była to ziemia uprawna. Odkrycia te zmieniły życie W a k s m a n a, który zajął się na stałe hodowlą promieniowców [20].

2. Bioaktywne metabolity promieniowców

Promieniowce należą do czołowych producentów związków o aktywności biologicznej, w tym o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, przeciwgrzybiczym, przeciwnowotworowym, przeciwrobaczym. Oszacowano, iż 80% poznanych antybiotyków pochodzenia naturalnego to metabolity promieniowców [29]. Spośród wielu rodzajów promieniowców to *Streptomyces, Saccharopolyspora, Amycolatopsis, Micromonospora, Actinoplanes* są odpowiedzialne za wytwarzanie większości biomolekuł istotnych komercyjnie. Rodzaj *Streptomyces*, należący do rodziny *Streptomycetaceae* i liczący około 500 gatunków wytwarza w przybliżeniu 80% wszystkich bioaktywnych metabolitów promieniowców [12]. Systematykę rodzaju *Streptomyces* przedstawiono w Tabeli I [17].

Przykładami znanych związków bioaktywnych wy+twarzanych przez promieniowce są streptomycyna, nystatyna, amfoterycyna B, aktynomycyna, awermektyna, takrolimus. Streptomycyna została wyizolowana w 1943 r. przez ucznia W a k s m a n a, Alberta S c h a t z a, który zauważył, iż szczep *Streptomyces griseus* (*S. griseus*) wytwarza związek o aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych i prątków gruźlicy. W 1952 r. za odkrycie streptomycyny Waksman otrzymał nagrodę Nobla [20]. Nystatyna, związek o działaniu przeciwgrzybiczym wytwarzany przez *S. noursei*, została odkryta w 1950 r. przez naukowców Rachel B r o w n i Elizabeth H a z e n. Kolejnym przykładem związków przeciwgrzybiczych jest amfoterycyna B, wytwarzana przez *S. nodosus*. Waksman odkrył również aktynomycynę, produkowaną przez szczep *S. antibioticus*, która obecnie znalazła zastosowanie jako lek przeciwnowotworowy m.in. w leczeniu guza Wilmsa u dzieci [20, 49].

Tabela I
Pozycja systematyczna rodzaju *Streptomyces* (wg Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [17])

Gromada XXVI (Phylum XXVI)	*Actinobacteria* phyl.nov.
Klasa I (Class I)	*Actinobacteria*
Rząd XIV (Order XIV)	*Streptomycetales* ord. nov.
Rodzina I (Family I)	*Streptomycetaceae*
Rodzaj I (Genus I)	*Streptomyces*

Promieniowce są producentami wielu antybiotyków. Wytwarzają związki przeciwbakteryjne należące do β-laktamów, aminoglikozydów, tetracyklin, makrolidów, glikopeptydów, lipopeptydów i innych. Przykłady antybiotyków należących do wymienionych grup umieszczono w Tabeli II. Kwas klawulanowy, inhibitor β-laktamaz jest wytwarzany przez *S. clavuligerus* [46, 49]. Złota era antybiotyków przypadała na lata 50–60. XX wieku. Ilość nowych odkryć w ostatnich latach znacznie spadła [20]. Jednakże w związku z narastającą opornością szczepów bakterii, zwłaszcza szczepów klinicznych, istnieje nieustanna potrzeba odkrywania nowych leków przeciwbakteryjnych, w tym pochodzenia naturalnego. Dlatego prowadzone są izolacje drobnoustrojów z różnych miejsc na Ziemi w kierunku pozyskania nowych szczepów promieniowców wytwarzających substancje antybiotyczne.

Metabolity promieniowców charakteryzuje duża różnorodność i złożoność struktur chemicznych. Pod względem budowy chemicznej związki wytwarzane przez promieniowce należą m in. do poliketydów, peptydów, butenolidów, chinonów, makrolidów, alkaloidów, laktonów, laktamów, terpenów, terpenoidów [46]. Szczepy promieniowców relatywnie rzadko produkują związki o budowie terpenoidów i flawonoidów, często wytwarzają struktury makrocyklicznych laktonów, laktamów, cyklopeptydów, depsypeptydów i policyklicznych pochodnych chinonów [6].

3. Miejsca występowania promieniowców

Promieniowce występują w różnych miejscach na Ziemi, aczkolwiek najbardziej pierwotnym źródłem ich izolacji jest gleba. Proces izolacji promieniowców z gleby jest zazwyczaj prosty. Ponadto pozyskiwanie promieniowców z gleby nie jest czasochłonne i nie wymaga dużych nakładów finansowych. Promieniowce występują także w innych źródłach: korzeniach roślin, opadłych liściach, mrowiskach, piasku pustynnym i wielu innych. Jednakże szczepy te są często izolowane z omawianych miejsc w ilościach mniejszych niż z gleby. Istotnym źródłem pozyskiwania promieniowców są morza i oceany, z których wielokrotnie izoluje się promieniowce wytwarzające metabolity o ciekawych strukturach chemicznych i aktywności biologicznej, często odmiennych od tych pozyskiwanych z gleby. Opisywano

Tabela II

Przykłady antybiotyków wytwarzanych przez promieniowce

Grupa antybiotyków	Przykład antybiotyku	Gatunek promieniowca	Piśmiennictwo
β-laktamy	Cefamycyna A, B, C	*Amycolatopsis lactamdurans* (dawniej *Streptomyces lactamdurans*), *S. clavuligerus*	[48]
	Tienamycyna	*S. cattleya*	[26]
Aminoglikozydy	Streptomycyna (aktynomycyna)	*S. griseus*	[25]
	Gentamycyna	*Micromonospora purpurea* *Micromonospora echinospora*	[42]
	Kanamycyna	*S. kanamyceticus*	[53]
	Neomycyna	*S. fradiae*	[55]
	Tobramycyna	*Streptoalloteichus tenebrarius* (dawniej *S. tenebrarius*)	[17, 34]
	Spektynomycyna	*S. spectabilis*	[47]
Tetracykliny	Chlorotetracyklina (aureomycyna)	*S. aureofaciens*	[57]
	Tetracyklina	*S. aureofaciens*	[9]
	Oksytetracyklina	*S. rimosus*	[14]
Makrolidy	Erytromycyna	*Saccharopolyspora erythraea*	[54]
	Spiramycyna	*S. ambofaciens*	[2]
	Oleandomycyna	*S. antibioticus*	[31]
Glikopeptydy	Teikoplanina	*Actinoplanes teichomyceticus*	[12]
	Wankomycyna	*Amycolatopsis orientalis*	[32]
Linkozamidy	Linkomycyna	*S. lincolnensis*	[33]
Lipopeptydy	Daptomycyna	*S. roseosporus*	[35]
Streptograminy	Prystynamycyna	*S. pristinaespiralis*	[4]
	Wirginiamycyna	*S. virginiae*	[11]
Antybiotyki o innej budowie	Fosfomycyna	*S. fradiae*	[41]
	Chloramfenikol	*S. venezuelae*	[13]
	Cykloseryna	*S. lavendulae, S. orchidaceus*	[45]
	Nowobiocyna	*S. caeruleus* (dawniej *S. niveus*)	[30]

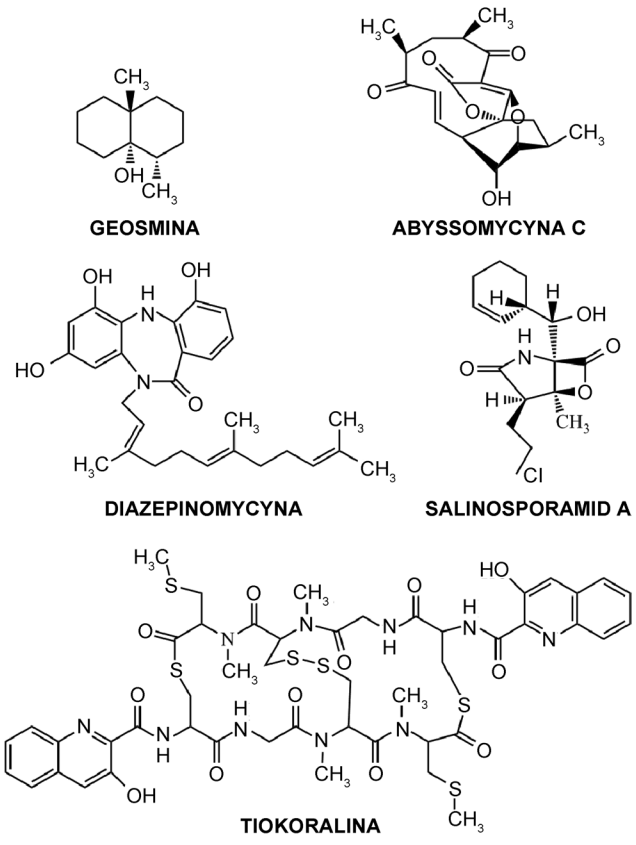
też pozyskiwanie tych drobnoustrojów z lodowców. Duża różnorodność miejsc występowania promieniowców może świadczyć o zdolnościach adaptacji tych drobnoustrojów do panujących warunków środowiska.

B é r d y w 2012 r. oszacował, iż do tej pory zidentyfikowano ze źródeł naturalnych przy pomocy dostępnych metod tylko około 1% promieniowców. Dzięki analizom DNA odkryto, że zróżnicowanie mikroorganizmów jest znacznie większe niż przypuszczano [6].

4. Promieniowce bytujące w glebie

Głównym źródłem pozyskiwania promieniowców jest gleba. Gleba jest miejscem łatwo dostępnym i to z niej od lat badacze izolowali próbki bogate w różnorodne mikroorganizmy, w tym promieniowce. Charakterystyczny zapach świeżo zaoranej lub wilgotnej ziemi pochodzi właśnie od obecności w niej szczepów promieniowców wytwarzających geosminę (Rys. 1) [15]. Związek ten został po raz pierwszy wyizolowany w 1965 r. z brzeczki fermentacyjnej gatunku *S. griseus*. Geosmina jest wytwarzana przez różne szczepy rodzaju *Streptomyces*, ale i przez cyjanobakterie, oraz niektóre grzyby [24].

Do tej pory do pozyskiwania promieniowców używano gleby z miejsc typowych: gospodarstw rolnych, ogrodów, lasów. Wiele antybiotyków jest wytwarzanych przez promieniowce pozyskiwane z gleby: streptomycyna, wankomycyna, aktynomycyna, neomycyna, daptomycyna i inne. Szacuje się, że streptomycynę wytwarza około 1% promieniowców bytujących w glebie. Dla porównania, tylko 1 na 10^7 promieniowców (izolowanych z ziemi) wytwarza daptomycynę [3]. Często, pomimo nieskomplikowanego procesu izolacji promieniowców bytujących w glebie, nie udaje się ich niestety wyhodować w warunkach laboratoryjnych. Jest to spowodowane specyficznymi wymaganiami środowiskowymi promieniowców, a także wzajemnymi oddziaływaniami z innymi mikroorganizmami, do jakich dochodzi w miejscu ich bytowania. Produkcja metabolitów



Rys. 1. Struktury chemiczne wybranych metabolitów promieniowców

wtórnych promieniowców jest swoistym rodzajem odpowiedzi na wpływ i ko-egzystencję w ziemi innych mikroorganizmów, ale i gospodarza czy środowiska [6].

Trwają prace nad udoskonaleniem podłóż i metod hodowli promieniowców w warunkach laboratoryjnych. Dla przykładu, szczepy izolowane z ziemi często posiewa się na płytki z podłożem zawierającym jako ważne źródło węgla i azotu, kwasy humusowe (humic acid--vitamin agar).

Już w latach 60-tych opisano badania wpływu pH gleby na produkcję antybiotyków przez promieniowce. Największą ilość związków przeciwbakteryjnych wytwarzały promieniowce posiane na gleby obojętne z 2,5% dodatkiem glukozy, podczas gdy na glebach kwaśnych i zasadowych również z dodatkiem glukozy, nie wykazano produkcji antybiotyku lub wykazano śladowe ilości związków przeciwbakteryjnych [50].

Badano również wpływ klimatu i urodzajności gleb na występowanie i zróżnicowanie promieniowców z ziemi [58]. Naukowcy z Chin (Yunan) pobrali próbki gleby z 22 różnych miejsc: terenów tropikalnych, subtropikalnych, górskich, o chłodnym klimacie, dziewiczych lasów, nieużytków, gruntów rolnych. Wyizolowali 29 rodzajów promieniowców, spośród których 4 zostały już wcześniej opisane. Największą ilość rodzajów promieniowców izolowano z gleb prastarych lasów (średnio 9 rodzajów/próbkę gleby), następnie z gruntów rolnych (średnio 6 rodzajów/próbkę gleby). Promieniowce izolowane z gleb umiarkowanie urodzajnych i wilgotnych były najbardziej zróżnicowane. W glebach suchych i ubogich w roślinność, a także w bardziej ostrych warunkach klimatycznych izolowano mniej szczepów i należały one głównie do rodzaju *Streptomyces*. Z próbek gleby pozyskanych ze wszystkich miejsc także najczęściej izolowano szczepy z rodzaju *Streptomyces* [58].

Doniesienia naukowe o odkrywaniu nowych bioaktywnych metabolitów promieniowców izolowanych z ziemi pojawiają się coraz rzadziej. W 2011 r. Z i n i wsp. opublikowali pracę dotyczącą izolacji dwóch szczepów promieniowców B8 i C2 należących do rodzaju *Streptomyces* z próbek ziemi otaczającej Uniwersytet Putra Malaysia w Malezji. Wytwarzały one związki o właściwościach przeciwbakteryjnych wobec *Bacillus* sp., *Escherichia coli, Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus, S. epidermidis*. Naukowcy ci badali też wpływ podłoża i temperatury inkubacji (28°C, 37°C) na wzrost promieniowców i produkcję wtórnych metabolitów. Zauważyli większy przyrost biomasy po inkubacji w niższej temperaturze (28°C). Oba szczepy wykazywały różnorodność wzrostu i produkcji metabolitów wtórnych w zależności od rodzaju podłoża i temperatury [60]. Badania te dowodzą, iż trudno jest zastosować na skalę komercyjną jednakowe podłoże dla wszystkich promieniowców, gdyż często preferują one inne źródła węgla, azotu, witamin. Niejednokrotnie jest to zależne od miejsca izolacji szczepu. Podłoża powinny być więc komponowane indywidualnie.

Promieniowce stanowią ważną populację mikroorganizmów w glebie. Szacuje się, iż stanowią 10% flory mikrobiologicznej ziemi [44]. Bakterie bytujące w glebie, często występują w tzw. ryzosferze roślinnej (strefie korzeniowej), mając wpływ na wzrost roślin i chroniąc ich korzenie od patogenów roślinnych (bakterii i grzybów chorobotwórczych). Przykładem, może być wyizolowany szczep *Streptomyces* AcH 505 wytwarzający auxofuran – związek przyspieszający i pozwalający na wystąpienie zjawiska mikoryzy (współzależności korzeni roślin z organizmami grzybów). Dodatkowo, auxofuran zapobiega zainfekowaniu korzeni roślin przez grzyby chorobotwórcze [44, 52].

Promieniowce bytujące w glebie mogą żyć w symbiozie z różnymi gatunkami roślin, a także grzybów. Przyczyniają się do ich lepszego wzrostu, ułatwiając pobieranie składników odżywczych. Mogą również wpływać na systemy obronne roślin, zwiększając ich odporność wobec bakterii i grzybów chorobotwórczych [44].

Istnieją doniesienia o pozyskiwaniu promieniowców z piasku pustynnego. O k o r o i wsp. wyizolowali szczepy z pustyni Atakama w Ameryce Południowej [39]. Miejsce to uchodzi za najbardziej suchą pustynię świata. Użycie selektywnej metody izolacji promieniowców z bardzo suchych terenów Atakamy, pozwoliło

na wyhodowanie dużej ilości różnorodnych szczepów. Próbki gleby mieszano z roztworem Ringera, uzyskując odpowiednie rozcieńczenia. Następnie mieszano w homogenizatorze i wytrząsano. Pobrane próbki nanoszono na płytki z 6 selektywnymi podłożami z dodatkiem antybiotyków (neomycyny, tetracykliny, rifampicyny), a także związków przeciwgrzybiczych (nystatyny, cykloheksimidu) i inkubowano w temperaturze 28°C przez 21 dni. Badania dowiodły, iż większość izolatów promieniowców należała do rodzaju *Amycolatopsis*, *Lechevalieria*, *Streptomyces*. Na podstawie cech morfologicznych wyizolowano 147 szczepów promieniowców. We wszystkich izolatach promieniowców z rodzajów *Amycolatopsis*, *Lechevalieria* i *Streptomyces* zidentyfikowano gen NRPS, odpowiedzialny za produkcję bioaktywnych związków o właściwościach przeciwgrzybiczych i przeciwnowotworowych [39].

Opisywano również izolację szczepów promieniowców z Pustyni Mojave w Kalifornii [51]. Z 9 próbek pobranych z różnych miejsc tej pustyni wyizolowano 335 szczepów promieniowców. Badano wpływ temperatury (27°–37°C) na liczbę i wielkość kolonii otrzymanych promieniowców. Liczba kolonii i ich wielkość była większa po inkubacji w temp 37°C. Wysunięto wnioski, iż optymalna temperatura do wzrostu promieniowców izolowanych z pustyni jest wyższa niż tych pozyskiwanych z gleby, co można też łatwo wytłumaczyć miejscem ich bytowania. Z 335 izolatów, tylko 2 produkowały związki bioaktywne: panosialinę (panosialin) o aktywności inhibicyjnej wobec enzymu glikozydazy, drugi-4-chlorotreoninę o właściwościach chwastobójczych. Wiele z wyizolowanych z pustyni szczepów należało do tzw. promieniowców rzadkich z rodzaju *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura* oraz *Saccharothrix*. Natomiast z piasku pustynnego nie udało się wyhodować szczepów z rodzaju *Micromonospora*, wymagającego łagodniejszych warunków klimatycznych. Szacuje się, iż w 1g piasku pustynnego znajduje się od 1×10^3 do 1×10^6 kolonii promieniowców, podczas gdy w 1g gleby znajduje się 1×10^7 tych kolonii. Piaski pustynne charakteryzują się więc ich mniejszym występowaniem [51].

Istnieją też doniesienia o izolacji promieniowców ze świeżych i opadłych liści m in. igieł sosny, liści bambusa, drzewa wiśniowego, cedru japońskiego, krwawnicy, japońskiej róży oraz drzewa kamforowego. Z 15 pobranych próbek liści, wyizolowano 77 szczepów. Połowa z nich należała do tzw. promieniowców rzadkich, pozostałe do rodzaju *Streptomyces*. Z igieł sosny pozyskano szczep *Streptomyces* sp. K96-5794, który wytwarzał diketopiperazynę o właściwościach przeciwnowotworowych [51].

Szczepy należące do rodzajów *Streptomyces*, *Pseudonocardia* i *Amycolatopsis* wyizolowano z mrowisk mrówek tnących liście, żyjących w symbiozie z grzybem *Leucoagaricus gongylophorus* [43]. Odkryto, iż szczepy z rodzaju *Pseudonocardia* tworzą na powłokach mrówek biofilm, chroniąc je przed różnymi patogenami. Promieniowce pozyskane z mrowisk wytwarzały związki należące do kandicydyn, antymycyn A1-A4 oraz walinomycyn, które posiadały właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciw grzybom chorobotwórczym, przez co wpływały ochronnie na *Leucoagaricus gongylophorus* (grzyb żyjący w symbiozie z mrówkami). Aktynomycyny silnie hamowały wzrost bakterii bytujących w glebie, a także innych promieniowców [43].

5. Promieniowce w środowisku morskim

Ważnym miejscem występowania promieniowców jest środowisko morskie. Pierwsze próby pozyskiwania promieniowców z mórz podjęto już w 1969 r. [61]. Jednak do tej pory wody mórz i oceanów nie budziły znacznego zainteresowania badaczy. Było to spowodowane m.in. tym, iż gleba dostarczała próbek bogatych w różnorodne promieniowce, a także panującą opinią, iż szczepy morskie i ich metabolity nie będą różnić się pod względem filogenetycznym, a także właściwościami biologicznymi od tych pozyskanych z gleby.

Obecnie uważa się że, oceany są największym źródłem mikroorganizmów i ich bioaktywnych metabolitów, gdyż pokrywają one 70% powierzchni Ziemi, a ich fauna i flora nie została jeszcze w większości odkryta [6].

Promieniowce występują w siedliskach morskich na różnych głębokościach m in. na powierzchni wody, głębinach wodnych, osadach dennych, wolno-pływających i osiadłych bezkręgowcach, i kręgowcach morskich [56].

W 2008 r. liczba opisanych wszystkich metabolitów pochodzenia morskiego przekroczyła 1000 [8]. Produkty metabolizmu promieniowców morskich wykazują wiele aktywności biologicznych, a także charakteryzują się różnorodnymi strukturami chemicznymi, często odmiennymi od związków wytwarzanych przez promieniowce bytujące w glebie [61]. Metabolity produkowane przez promieniowce morskie często zawierają w swojej budowie chemicznej podstawniki halogenkowe, co odróżnia je od związków wytwarzanych przez te drobnoustroje w glebie.

Promieniowce morskie, w porównaniu do izolatów z gleby, są w warunkach laboratoryjnych trudne do hodowli ze względu na ich specyficzne wymagania środowiskowe (m.in. zawartość składników mineralnych w podłożu, stężenie chlorku sodu, ciśnienie, temperatura). Szacuje się iż tylko około 5% promieniowców morskich może być wyhodowana w standardowych warunkach laboratoryjnych [21]. Trwają prace na udoskonaleniem technik izolacji i hodowli promieniowców morskich. Jedną z nowych technik hodowli szczepów z gąbek i osadów dennych jest HTC (high-throughput cultivation), polegająca na naśladowaniu warunków panujących w naturze. Komórki drobnoustrojów zagęszcza

się poprzez odwirowanie w gradiencie, a następnie miesza z agarozą i olejem, w celu uzyskania mikrokropelek (microdroplets) o średnicy 20–70 μm. Większość mikrokropelek powinno zawierać pojedyncze komórki drobnoustrojów. Następnie mikrokropelki przenosi się do specjalnej, sterylnej komory fermentacyjnej wypełnionej podłożem i wyposażonej w filtry. Filtr końcowy umożliwia wypływ pojedynczych komórek drobnoustrojów i ich metabolitów. Metoda HTC pozwala oddzielić szybko rosnące bakterie od promieniowców rosnących wolno i zapewnia im odpowiednie warunki do wzrostu. Stosuje się podłoża ubogie w składniki odżywcze, naśladujące warunki, które panują w środowisku. Ponadto technika ta umożliwia komunikację między komórkami mikroorganizmów i tym samym również upodabnia panujące warunki do tych środowiskowych [18].

W badaniu przeprowadzonym przez I m a d a i wsp. porównywano wzrost szczepów promieniowców izolowanych ze środowiska morskiego i z gleby w Japonii. Drobnoustroje należące do rodzaju *Streptomyces* i *icromonospora,* pozyskane z Morza Japońskiego wykazywały większą tolerancję wobec wysokich stężeń soli (odpowiednio 12% i 5% chlorku sodu), w porównaniu do izolatów z ziemi, które w obecności soli nie wykazywały wzrostu ani produkcji wtórnych metabolitów [22].

Niektóre rodzaje promieniowców są charakterystyczne głównie dla środowiska morskiego m.in. *Salinispora*, *Marinispora*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium*, *Sciscionella*, *Serinicoccus* [55]. Jednakże z mórz i oceanów pozyskuje się także promieniowce należące do rodzajów, izolowanych z innych środowisk (gleby), np. *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Frankia*, *Gordonia*, *Kitasatospora*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Micrococcus*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Solwaraspora*, *Verrucosispora* [12]. Rodzaj *Streptomyces* wytwarza największe ilości bioaktywnych metabolitów również wśród producentów morskich [61].

Przykładami związków wytwarzanych przez promieniowce morskie są diazepinomycyna, abyssomycyna C [3], tiokoralina, salinosporamid A (Rys 1). Diazepinomycyna jest wytwarzana przez szczep *Micromonospora* sp. i posiada właściwości indukcji apoptozy. Abyssomycyna C to policykliczny poliketyd, który został wyizolowany jako metabolit szczepu *Verrucosispora* sp. Posiada właściwości przeciwbakteryjne wobec metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (MRSA), a także wobec *Mycobacterium tuberculosis* [61]. Tiokoralina, metabolit szczepu *Micromonospora marina*, bicykliczny oktadepsypeptyd posiada właściwości przeciwbakteryjne wobec *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*. Tiokoralina wykazuje unikatowy mechanizm działania, inhibicji polimerazy DNA α, co prowadzi do zakłócenia cyklu komórkowego i śmierci komórki bakteryjnej [61]. Jednakże stwierdzono również jej cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych [21]. Salinosporamid posiada właściwości cytotoksyczne wobec linii komórek nowotworowych krwi (chłoniaków, białaczek), guzów twardych. Salinosporamid A jest metabolitem *Salinispora tropica*. Gatunki *S. tropica* i *Salinispora arenicola* posiadają specyficzne wymagania środowiskowe. Do swego wzrostu potrzebują w podłożu wysokich stężeń chlorku sodu [61].

Lucentamycyny, mansouramycyny A-D, tartrolon D, lodopyridon są metabolitami promieniowców izolowanych ze środowiska morskiego o właściwościach cytotoksycznych wobec linii komórek nowotworowych [7].

Trioksakarcyny są metabolitami *Streptomyces* sp. B8652 o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych i przeciwmalarycznych [7]. Proksymycyny należą do antybiotyków o budowie aminofuranowej [8]. Są wytwarzane przez szczep promieniowca *Verrucosispora maris*, wyizolowanego z osadów Morza Japońskiego i z innego gatunku *Verrucosispora* sp. izolowanego z osadów fiordu w Norwegii. Proksymycyna B posiada właściwości przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-dodatnich, a proksymycyna C aktywność wobec *Brevibacillus brevis*. Wszystkie proksymycyny posiadają działanie przeciwnowotworowe (cytotoksyczność wobec linii komórek nowotworowych żołądka, wątroby, piersi) [8].

Cennym źródłem pozyskiwania promieniowców są bezkręgowce morskie, gąbki (Porifera). Zaobserwowano, iż promieniowce występują częściej w tych gąbkach, które zawierają inne różnorodne rodziny bakterii, w tym inne promieniowce [56]. W 2010 r. A b d e l m o h s e n i wsp. opublikowali pracę dotyczącą izolacji 90 szczepów promieniowców z 11 różnych rodzajów gąbek zebranych u wybrzeży Egiptu (Ras Mohamed) i Chorwacji (Rovinj) [1]. Promieniowce należały głównie do rodzajów *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Brevibacterium* i *Kocuria*. Cztery związki wytwarzane przez pozyskane szczepy promieniowców wykazywały działanie wobec bakterii Gram-dodatnich, a inne cztery właściwości przeciw *Trypanosoma brucei*, dwa związki działały na *Leishmania major* [1]. Z gąbek *Haliclona* sp. zebranych u wybrzeży Japonii, wyizolowano 3 nowe gatunki promieniowców: *S. tateyamensis* sp. nov., *S. marinus* sp. nov. and *S. haliclonae* sp. nov. Wszystkie izolaty wykazywały obfity wzrost na podłożach z 2–7% (m/v) dodatkiem NaCl; pH 6,0–8,0 (*S. marinus* sp. nov. pH 6,0–9,0), a także w temperaturze 15–37°C (*S. marinus* sp. nov. 20–30°C) [28].

W innej pracy opisano izolację 462 szczepów promieniowców z 18 różnych gąbek. Szczepy te należały do 19 rodzajów, jednakże większość z nich reprezentowała rodzaj *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* i *Micromonospora*. Zróżnicowanie szczepów i ich obfitość występowania była zależna od budowy gąbki. Gąbki o gęsto ułożonych tkankach zawierały więcej mikroorganizmów, w tym promieniowców, niż te o tkankach luźno ułożonych [27].

Promieniowce występują również w osadach dennych. Z osadów Zatoki Bengalskiej i Morza Andamańskiego pobrano 4 różne próbki osadów, z których wyizolowano 42 szczepy promieniowcó. 58% z nich wykazywało aktywność biologiczną wobec co najmniej jednej z bakterii testowych: *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi* [5].

6. Inne źródła

Istnieją liczne doniesienia naukowe o izolacji promieniowców z innych miejsc, niż wyżej wymienione, np. z lodowców i ziem Antarktyki.

Yan i wsp. izolowali mikroorganizmy z próbek śniegu i lodu pobranych we wschodniej części Antarktyki. Drobnoustroje należały do 5 różnych filogenetycznie grup: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* i *Bacteroidetes*. Najwięcej wyizolowanych szczepów (43%) reprezentowało klasę *Actinobacteria*. Promieniowce tam występujące zaklasyfikowano do rodzaju *Microbacterium*, *Dermacoccus, Kocuria*, *Clavibacter* oraz *Kytococcus* [59].

Promieniowce należące do rodzaju *Streptomyces*, *Actinomadura* i *Kitasatospora* zostały wyizolowane również z ziem Antarktyki. Z 47 szczepów promieniowców, 19 wykazywało aktywność biologiczną (przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram--ujemnych) [36].

Opisano również pozyskanie promieniowców z Arktyki, potencjalnych inhibitorów biofilmu tworzonego przez *Vibrio cholerae*. Wyizolowano 31 szczepów promieniowców z 4 próbek osadów. Trzy z nich (A733 i A745 należące do rodzaju *Streptomyces* i A731 do *Nocardiopsis*) wykazywały bioaktywność. Supernatant hodowli promieniowca A745 powodował około 88% zahamowanie formowania biofilmu, podczas gdy supernatanty hodowli szczepu A733 i A731 wykazywały 80% zahamowanie tworzenia biofilmu przez *V. cholerae* [38].

Innym, ciekawym źródłem promieniowców mogą być jaskinie. Jaskinie nie budziły dotychczas zainteresowania badaczy ze względu na ubogość środowiska w składniki odżywcze i niską temperaturę. Jednakże, duża wilgotność jaskiń sprzyja wzrostowi promieniowców. Nakaew i wsp. opisali izolację promieniowców z jaskiń w Tajlandii [37]. Wyizolowali 377 szczepów, z których 55% należało do rodzaju *Streptomyces*, a pozostałe do tzw. promieniowców rzadkich (m.in. *Micromonospora*, *Catellatospora*, *Spirillospora*, *Nonomuraea*). Dwa ostatnie wymienione rodzaje zostały po raz pierwszy wyizolowane z ziemi z jaskiń [37].

Ciekawym źródłem pozyskiwania promieniowców są pajęczyny. W pracy Iwai i wsp. zebrano 196 próbek pajęczyn, jaj pająków i innych pozostałości pająków, z których łącznie wyizolowano 1 159 szczepów promieniowców. Eksperyment przeprowadzono w Japonii. Z tej liczby, większość należała do rzędu *Streptomycetales* i *Micromonosporales* [23].

Promieniowce odgrywają ważną w rolę w procesach rozkładu materii organicznej i ograniczaniu przykrego zapachu kompostu. Izoluje się je z kompostów, oborników, pasz zwierzęcych. Szczepy promieniowców izolowane z kompostu świń najczęściej należały do gatunku *Saccharomonospora viridis, Thermobifida fusca* i *Actinomadura* spp. Odkryto, iż *Thermobifida fusca* wytwarza wiele enzymów, m.in. celulazy, proteinazy serynowe, liazy poligalakturonianowe, które mogą odgrywać ważną rolę w rozkładzie materii organicznej [19].

7. Podsumowanie

Ze względów ekonomicznych wiele dużych firm farmaceutycznych, głównie nastawionych na zyski, zaprzestało poszukiwań nowych związków bioaktywnych (przeciwbakteryjnych), będąc bardziej zainteresowane poszukiwaniem leków na choroby przewlekłe. Jednakże wiele mniejszych, wyspecjalizowanych firm biotechnologicznych/ farmaceutycznych, a także instytucje naukowe stale poszukują nowych źródeł izolacji promieniowców oraz metabolitów o ciekawych strukturach i mechanizmach działania [6].

Promieniowce izoluje się z bardzo wielu miejsc na Ziemi, a szczególnie powszechnie występują w glebie. Oszacowano, iż ze źródeł morskich są one izolowane 10^4 rzadziej niż z gleby. Szczególną różnorodność promieniowców wykazują gleby urodzajne w wilgotnych strefach klimatycznych tropikalnych i subtropikalnych. Mniej promieniowców izoluje się z terenów suchych (piasków pustynnych) i miejsc o ostrym klimacie (ziem Antarktyki). Promieniowce mają zdolność dostosowywania się do warunków klimatycznych (wilgotności, nasłonecznienia oraz temperatury). Rodzaj *Streptomyces* bardzo powszechnie występuje we wszystkich miejscach na Ziemi. Metabolity promieniowców były, są i będą obiektem zainteresowań badaczy ze względu na oryginalność ich struktur chemicznych, a także ze względu na zróżnicowanie ich właściwości biologicznych i mechanizmów działania. Tak dużą różnorodność strukturalną związków chemicznych trudno uzyskać w wyniku syntezy chemicznej w laboratorium. Metabolity wtórne promieniowców mogą być nie tylko potencjalnymi lekami, ale także posłużyć jako struktury modelowe do dalszych modyfikacji chemicznych, mających na celu poprawę ich właściwości biologicznych.

Podziękowania

Praca jest współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013; projekt „Potencjalny antybiotyk oraz metoda pozyskiwania nowych związków przeciwbakteryjnych" nr: UDA-POIG.01.03.01-14-136/09.

Piśmiennictwo

1. Abdelmohsen U.R., Pimentel-Elardo S.M., Hanora A., Radwan M., Abou-El-Ela S.H., Ahmed S., Hentschel U.: Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-Infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Mar. Drugs*, **8**, 399–412 (2010)
2. Albouy R., Duchesnay G., Eloy P., Pestel M., RVINA A., Rey M.: A new French antibiotic: spiramycin. *Antibiot. Annu.* **3**, 223–227 (1955–1956)
3. Baltz R.H.: Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 557–563 (2008)
4. Barber M., Waterworth P.M.: Antibacterial activity of lincomycin and pristinamycin: a comparison with erythromycin. *Brit. Med. J.* **2**, 603–606 (1964)
5. Baskaran R., Vijayakumar R., Mohan P.M.: Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian J. Microbiol.* **7**, 26–32 (2011)
6. Bérdy J.: Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J.Antibiot*. **65**, 385–395 (2012)
7. Bhatnagar I., Kim S.-K.: Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. *Mar. Drugs* **8**, 2673–2701 (2010)
8. Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T., Prinsep M.R.: Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 165–237 (2010)
9. Boothe J.H., Morton J., Petisi J.P., Wilkinson R.G., Williams J.H.: Tetracyline. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4621 (1953)
10. Cynamon M.H., Granato P.A.: Comparison of the *In vitro* Activities of Teichomycin A_2 and Vancomycin Against Staphylococci and Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**, 504–505 (1982)
11. De Somer P., Van Dijck P.: A preeliminary report on antibiotic number 899, a streptogramin-like substance. *Antibiot. Chemother.* **5**, 632 (1955)
12. Dharmaraj S.: Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 2123–2139 (2010)
13. Ehrlich J., Gottlieb D., Burkholder P.R., Anderson L.E., Pridham T.G.: *Streptomyces venezuelae*, n. sp., the source of chloromycetin. *J. Bacteriol*. **56**, 467–477 (1948)
14. Finlay A.C., Hobby G.L. i wsp.: Terramycin, a new antibiotic. *Science*, **111**, 85 (1950)
15. Gerber N.N., Lechevalier H.A.: Geosmin, an Earthy-Smelling Substance Isolated from Actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**, 935–938 (1965)
16. Goodfellow M., Fiedler H.P.: A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **98**, 119–142 (2010)
17. Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J.,Trujillo M.E., Suzuki K., Ludwig W., Whitman W.B.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed.,Vol. 5: The Actinobacteria. Part B., Springer Verlag, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2012
18. Hames-Kocabas E.E., Uzel A.: Isolation strategies of marine--derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *J. Microbiol. Meth.* **88**, 342–347 (2012)
19. Hayakawa M., Yamamura H., Nakagawa Y., Kwa Y., Hayashi Y., Misonou T., Kaneko H.: Taxonomic diversity of Actinomycetes Isolated from Swine Manure Compost. *Actinomycetologica*, **24**, 58–62 (2010)
20. Hopwood D.A.: Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford University Press, New York 2007, s. 8–23
21. Hughes Ch.C., Fenical W.: Antibacterials from the Sea. *Chemistry*, **16**,12512–12525 (2010)
22. Imada Ch., Masuda S., Kobayashi T., Hamada-Sato N., Nakashima T.: Isolation and Characterization of Marine and Terrestrial Actinomycetes Using a Medium Supplemented with NaCl. *Actinomycetologica*, **24**, 12–17 (2010)
23. Iwai K., Iwamoto S., Aisaka K., Suzuki M.: Isolation of Novel Actinomycetes from Spider Materials. *Actinomycetologica*, **23**, 8–15 (2009)
24. Jiang J., He X., Cane D.E.: Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional Streptomyces coelicolor enzyme. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 711–715 (2007)
25. Jones D., Metzger H.J., Schatz A., Waksman S.A.: Control of Gram-negative bacteria in experimental animals by streptomycin. *Science*, **100**, 103–105, (1944)
26. Kahan J.S., Birnbaum J. i wsp.: Thienamycin, a new β-lactam antibiotic. I Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J. Antibiot*. **32**, 1–12 (1979)
27. Khan S.T., Takagi M., Shin-ya K.: Diversity, Salt Requirement, and Antibiotic Production of Actinobacteria Isolated from Marine Sponges. *Actinomycetologica*, **24**, 18–23 (2010)
28. Khan S.T., Tamura T., Takagi M., Shin-ya K. *Streptomyces tateyamensis* sp. nov., *Streptomyces marinus* sp. nov. and *Streptomyces haliclonae* sp. nov., isolated from the marine sponge *Haliclona* sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **60**, 2775–2779 (2010)
29. Kumar N., Singh R.K., Mishra S.K, Singh A.K., Pachouri U.C.: Isolation and screening of soil Actinomycetes as a source of antibiotics active against bacteria. *Int. J. Microbiol. Res.* **2**, 12–16 (2010)
30. Lin F.K., Coriell L.L.: Novobiocin, a laboratory and clinical evaluation. *Antibiot. Med. Clin. Ther.* **2**, 268–276 (1956)
31. Marmell M., Prigot A.: Oleandomycin; a report on its use in gonorrhea in the male. *Antibiot. Annu.* 44–47 (1956–1957)
32. McCormick M.H., McGuire J.M., Pittenger G.E., Pittenger R.C., Stark W.M.: Vancomycin, a new antibiotic.I. Chemical and biological properties. *Antibiot. Annu.* **3**, 606–611 (1955–1956)
33. Meyer C.E., Lewis C.: Absorption and fate of lincomycin in the rat. *Antimicrob. Agents Chemother*. **161**, 169–175 (1963)
34. Meyer R.D., Young L.S., Amstrong D.: Tobramycin (nebramycin factor 6): in vitro activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol*. **22**, 1147–1151 (1971)
35. Miao V., Baltz R.H.: Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus* : cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, **151**,1507–1523 (2005)
36. Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova--Nikolova S., Bogatzevska N.: Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *J. Culture Collections*, **3**, 3–14 (2002)
37. Nakaew N., Pathom-aree W., Lumyong S.: Generic Diversity of Rare Actinomycetes from Thai Cave Soils and Their Possible Use as New Bioactive Compounds. *Actinomycetologica*, **23**, 21–26 (2009)
38. Nimmy A., Wilson P.A., Savita K., Sabu T.: Arctic Actinomycetes as Potential Inhibitors of Vibrio cholerae Biofilm. *Curr. Microbiol*. **64**, 338–342 (2012)
39. Okoro Ch.K., Brown R., Jones A.L., Andrews B.A., Asenjo J.A., Goodfellow M., Bull A.T.: Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, **95**, 121–133 (2009)
40. Osada Ch. i wsp.: List of new scientific names and nomenclatural changes in the class *Actinobacteria* validly published in 2011; *SAJ NEWS,* **26,** S4–S22 (2012)
41. Rogers T.O., Birnbaum J.: Biosynthesis of Fosfomycin by *Streptomyces fradiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5,** 121–132 (1974)
42. Rosselet J.P., Marquez J., Meseck E., Murawski A., Hamdan A., Joyner C., Schmidt R., Migliore D., Herzog H.L.: Isolation,

purification, and characterization of gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **161**, 14–16 (1963)
43. Schoenian I., Spiteller M., Ghaste M., Wirth R., Herz H., Spiteller D.: Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ant. *Proc. Nat. Acad. Scie.* **108**, 1955–1960 (2011)
44. Schrey S.D., Tarkka M.T.: Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie van Leeuwenhoek*, **94**, 11–19 (2008)
45. Shull G., Sardinas J.: PA-94, an antibiotic identical with D-4-amino-3-isoxazolidone (cycloserine,oxamycin). *Antibiot. Chemother.* **6**, 708 (1956)
46. Solanki R.: Bioactive compounds from marine actinomycetes. Review. *Ind. J. Microbiol.* **48**, 410–431 (2008)
47. Sparling P.F., Yobs A.R., Billings T.E., Hackney J.F.: Spectinomycin sulfate and aqueous procaine penicillin G in treatment of female gonorrhea. *Antimicrob. Agents Chemother*. **5**, 689–692 (1965)
48. Stapley E.O., Jackson M., Hernandez S., Zimmerman S.B., Currie S.A., Mochales S., Mata J.M., Woodruff H.B., Hendlin D.: Cephamycins, a New family of β-lactam antibiotics. I. Production by Actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans*, sp n.. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 122–131 (1972)
49. Starościak B.J., Stefańska J., Betlejeska K., Laudy A.E., Filipek J., Kurzątkowski W., Solecka J., Rozbicka B.: Wybrane Zagadnienia z Mikrobiologii Farmaceutycznej. Zeszyt 2. Promieniowce. Akademia Medyczna w Warszawie 1998
50. Stevenson I.L.: Antibiotic Activity of Actinomycetes in Soil and their Controlling Effects on Root-rot of Wheat. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 440–448 (1956)
51. Takahashi Y., Omura S.: Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 141–154 (2003)
52. Tarkka M.T., Lehr N.A., Hampp R., Schrey S.D. Plant behavior upon contact with Streptomycetes. *Plant Signaling and Behavior*, **3**, 917–919 (2008)
53. Umezawa H., Ueda M., Maeda K., Yagishita K., Kondo S., Okami Y., Utahara R., Osato Y., Nitta K., Takeuchi T.: Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J. Antibiot.* **10**, 181–188 (1957)
54. Vannucchi V.: Clinical study of a new antibiotic; erythromycin. *Riv. Crit. Clin. Med*. **52**, 128–136 (1952)
55. Waksman S.A., Lechevalier H.A.: Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. *Science*, **109**, 305–307, (1949)
56. Ward A.C, Bora N.: Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr. Opin. Microbiol*. **9**, 279–286 (2006)
57. Wright L.T., Sanders M. i wsp.: Aureomycin; a new antibiotic with virucidal properties; a preliminary report on successful treamtnet in 25 cases of lymphogranuloma venereum. *J. Am. Med. Assoc.* **138**, 402–412 (1948)
58. Xu L-H., Li Q-R., Jiang C-L.: Diversity of Soil Actinomycetes inmYunann, China. *Applied and Environmental. Microbiol.* **62**, 244–248 (1996)
59. Yan P., Hou S., Chen T., Ma X., Zhang S.: Culturable bacteria isolated from snow cores along the 1300 km traverse from Zhongshan Station to Dome A, East Antarctica. *Extremophiles*, **16**, 345–354 (2012)
60. Zin N.Z.M., Tasrip N.A., Desa M.N.M., Kqueen Ch.Y., Zakaria Z.A., Hamat R.A., Shamsudin M.N.: Characterization and antimicrobial acitivities of two *Streptomyces* isolates from soil in the periphery of Universiti Putra Malaysia. *Trop. Biomed*. **28**, 651–660 (2011)
61. Zotchev S.B.: Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *J. Biotechnol.* **158**, 168–175 (2012)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 93–103
http://www.pm.microbiology.pl

ROLA CZYNNIKÓW ZAKAŹNYCH W CHOROBACH NEURODEGENERACYJNYCH

Michał Wiciński[1]*, Paulina Sopońska[1], Bartosz Brzoszczyk[1], Bartosz Malinowski[1], Elżbieta Grześk[1], Agnieszka Michalska[2]

[1] Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetet Mikołaja Kopernika w Toruniu
[2] Katedra Anatomii i Fizjologii. Akademia Wychowania Fizycznego im. Józefa Piłsudskiego w Warszawie Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu w Białej Podlaskiej

Wpłynęło w sierpniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Choroba Alzheimera. 2.1. *Chlamydophila pneumoniae*. 2.2. Wirus opryszczki pospolitej typu 1. 2.3. Krętki. 2.4. *Helicobacter pylori.* 3. Choroba Parkinsona. 3.1. Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS). 3.2. *Toxoplasma gondii*. 4. Stwardnienie rozsiane. 4.1. Wirus Epsteina-Barr. 4.2. Wirus Torque teno. 4.3. Ludzki Herpeswirus typu 6. 4.4. *Chlamydophila pneumoniae.* 5. Podsumowanie

Role of infections factors in neurodegenerative diseases

Abstract: Pathogens are possible risk factors for chronic degenerative diseases of the nervous system. This paper summarizes the evidence of infectious agents' relationship with neurodegenerative diseases and current knowledge about the role of pathogens in the modulation of immunological mechanism in the most common degenerative diseases: Alzheimer disease, Parkinson disease and multiple sclerosis. Infections with *Chlamydia pneumoniae*, Herpes simplex virus type 1, spirochaete and *Helicobacter pylori* may constitute risk factors for the Alzheimer disease. Human immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in the brain can cause parkinsonism. Epstein-Barr virus and co-infection with Torque teno virus as well as Human herpes virus type 6 and *Chlamydia pneumoniae* may play a role in the pathogenesis of multiple sclerosis.

1. Introduction. 2. Alzheimer's disease. 2.1. *Chlamydophila pneumoniae*. 2.2. Herpes simplex virus 1. 2.3. Spirochetes. 2.4. *Helicobacter pylori*. 3. Parkinson's disease. 3.1. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). 3.2. *Toxoplasma gondii*. 4. Multiple sclerosis. 4.1. Epstein-Barr virus. 4.2. Torque teno virus. 4.3. *Human Herpesvirus 6*. 4.4. *Chlamydophila pneumoniae*. 5. Summary

Słowo kluczowe: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroby neurodegeneracyjne, czynniki infekcyjne, stwardnienie rozsiane
Key words: Alzheimers disease, Parkinson disease, neurodegenerative diseases, infections factors, sclerosis multiplex

1. Wprowadzenie

Neurodegeneracyjne choroby ośrodkowego układu nerwowego (OUN), wśród których za najczęstsze uważa się: chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona i stwardnienie rozsiane, wynikają ze stopniowej, postępującej utraty komórek nerwowych. Z powodu ciągle rosnącej grupy pacjentów, choroby te od lat stanowią istotny problem zdrowia publicznego. Uznanymi czynnikami ryzyka większości chorób neurodegeneracyjnych są polimorfizmy genetyczne i starszy wiek. Celem modyfikacji prewencji i terapii tych schorzeń poszukuje się kolejnych środowiskowych czynników ryzyka [9]. Najnowsze koncepcje zakładają udział infekcji, jako czynnika inicjującego procesy neurodegeneracyjne OUN.

Doniesienia o wolniejszym przebiegu choroby Alzheimera i późniejszym narastaniu deficytów poznawczych u pacjentów z rozpoznanym zapaleniem stawów, lub trądem, leczonych lekami przeciwzapalnymi, tj.: niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, glikokortykosteroidami, metotreksatem, bądź dapsonem, pozwoliły wysunąć podejrzenie o znaczeniu procesów zapalnych w patogenezie tej choroby [8]. Zgodnie z obecną wiedzą zmiany zapalne mają istotne znaczenie w patogenezie choroby Alzheimera. Odkryto komórki ściśle związane z procesem zapalnym w przebiegu tej choroby, są to m.in. „reaktywne" astrocyty, czy komórki mikrogleju, które reagując na patologiczne procesy w obrębie OUN, mogą prowadzić do destrukcji neuronów. Warto podkreślić, że ich obecność stwierdzono w sąsiedztwie patologicznych złogów amyloidu beta, patognomicznych dla choroby Alzheimera [99]. Te obserwacje zapoczątkowały poszukiwania patogenów mogących uczestniczyć w indukcji procesów zapalnych toczących się w OUN.

W przypadku zespołu Parkinsona rola czynników infekcyjnych jest znana znaczniej dłużej. Pierwsze doniesienia o udziale zakażeń w patogenezie zespołu Parkinsona pojawiły się kilkadziesiąt lat temu, opisano wówczas szczególną późną postać kiły układu nerwowego, w której klinicznie obserwowano drżenie sugerujące chorobę Parkinsona [59]. Należy jednak podkreślić, że w patogenezie zespołu Parkinsona największą

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.: (052) 585-35-86, faks: (052) 585-40-23, e-mail: wicinski4@wp.pl

rolę odgrywa lokalizacja zmian neurodegeneracyjnych. Ta zależność jest szczególnie widoczna u pacjentów z wągrzycą mózgu, u których obecność zmian w obrębie jąder podstawy wywołuje zespół Parkinsona, ustępujący po skutecznym leczeniu przyczynowym [74, 83].

W etiologii stwardnienia rozsianego, podobnie jak i w innych chorobach zapalnych, czy autoimmunologicznych, przewaga czynników środowiskowych nad genetycznymi, wydaje się być coraz bardziej oczywista. Opisano dwa najbardziej prawdopodobne immunologiczne mechanizmy udziału czynników zakaźnych w chorobach zapalnych – molekularną mimikrę oraz zjawisko *bystander activation*. Molekularna mimikra polega na tworzeniu się krzyżowej reakcji przeciw komórkom gospodarza w wyniku kontaktu z antygenem pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego o zbliżonej strukturze. Natomiast *bystander activation* wynika z rozprzestrzeniania się procesu zapalnego na sąsiadujące, zdrowe tkanki poprzez aktywację autoreaktywnych limfocytów przez toczący się proces zapalny [34].

W pracy omówiono aktualne doniesienia o roli czynników infekcyjnych w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Uwzględniono najczęściej opisywane bakterie i wirusy, potencjalnie stanowiące czynniki etiologiczne choroby Alzheimera, choroby Parkinsona i stwardnienia rozsianego.

2. Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (ChA) jest jednostką chorobową o nieznanej etiologii, charakteryzującą się szybkim narastaniem deficytów poznawczych oraz pogarszaniem kompetencji emocjonalnych [95]. Oszacowano, że w 2005 r. liczba przypadków ChA na świecie wynosiła 24,2 miliony, natomiast 4,6 milionów nowych przypadków pojawia się w każdym kolejnym roku. W zależności od lokalizacji geograficznej zapadalność na ChA waha się od 8 do 10,5 przypadków na 1000 osób, współczynnik ten wyraźnie wzrasta między siódmą a ósmą dekadą życia [77]. Podobne badania epidemiologiczne w Polsce wskazują na rozpowszechnienie ChA od 1,4% wśród osób powyżej 45 r.ż. do 5,7% wśród osób powyżej 65 r.ż. [41]. Rozpoznanie otępienia wywołanego chorobą Alzheimera w świetle obecnej wiedzy medycznej pozostaje rozpoznaniem *stricte* klinicznym. Jedynie do celów naukowych w diagnostyce wykorzystywane jest oznaczanie parametrów biologicznych [57]. Zmiany histopatologiczne obserwowane w przebiegu ChA to pozakomórkowe odkładanie złogów amyloidu beta (Aβ) oraz zwyrodnienie włókienkowe neuronów (NFT) wywołane nagromadzeniem ufosforylowanego białka Tau [77, 95]. Typowo zmiany patologiczne lokalizują się w obrębie: części podstawnej przodomózgowia, hipokampu, węchomózgowia, oraz kory skroniowej [95].

2.1. *Chlamydophila pneumoniae*

Chlamydophila pneumoniae jest wewnątrzkomórkowym patogenem, występującym w dwóch formach rozwojowych, jako ciałka elementarne (EB) oraz ciałka siateczkowate (RB). *C. pneumoniae* stanowi czynnik etiologiczny pozaszpitalnego zapalenia płuc, zapalenia gardła, oskrzeli i zatok, przewlekłego zapalenia oskrzeli oraz astmy. Obecność przeciwciał przeciwko *C. pneumoniae* stwierdza się u 50% osób w wieku 20 lat oraz w granicach 70–80% u osób w wieku 60–70 lat [5]. Pierwsze doniesienia o udziale przewlekłego zakażenia wywołanego *C. pneumoniae* w patogenezie ChA pojawiły się w 1998 r. Na podstawie badań z wykorzystaniem metody PCR, analizy ultrastrukturalnej oraz immunohistochemicznej wykonanych na materiale sekcyjnym stwierdzono obecność materiału genetycznego oraz lipopolisacharydu *C. pneumoniae* u 90% badanych ze zdiagnozowaną ChA [3]. Badanie metodą PCR wykonane dla sekwencji nukleotydowych innych patogenów: *Chlamydia trachomatis*, *Borellia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae* oraz *Mycoplasma hominis* nie potwierdziły ich obecności w badanych tkankach [3]. Istotnym dowodem potwierdzającym związek zakażenia *C. pneumoniae* z rozwojem ChA jest typowa dla przebiegu zmian neurodegeneracyjnych lokalizacja wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych antygenów bakteryjnych morfologicznie odpowiadającym ciałkom EB i RB. Do okolic o największej koncentracji tych zmian należą hipokamp [3, 27], kora skroniowa [3, 27] i kora czołowa [27]. Nie obserwuje się rozproszenia tych zmian w obrębie całego mózgowia. Wynik badania z użyciem metody PCR w kierunku *C. pneumoniae* jest ujemny dla okolic niepatognomicznych dla ChA, np. na wycinkach pobranych z móżdżku [3]. Na podstawie obserwacji klinicznych opracowano trzy koncepcje udziału infekcji bakteryjnej w patogenezie ChA [88]. Po pierwsze infekcja *C. pneumoniae* może prowadzić do zaburzenia funkcji śródbłonka, co stanowi istotny czynnik ryzyka ChA [88]. Według innej koncepcji zakażenie *C. pneumoniae* prowadzi do aktywacji mikrogleju i zwiększonego wydzielania neurotoksycznych czynników zapalnych [88]. Z badań klinicznych wynika, że najczęstszymi komórkami, w których obserwuje się ciałka EB i RB, są astrocyty, perycyty i komórki mikrogleju, które wykazują zdolność do indukcji procesu zapalnego poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych, głównie Il-1β oraz TNF-α [3, 27]. Badanie wycinków z hipokampa myszy celowo zainfekowanych *C. pneumoniae* potwierdza zwiększoną aktywację komórek mikrogleju wywołaną zakażeniem [96]. Ostatnia koncepcja zakłada bezpośredni związek między zakażeniem *C. pneumoniae*, a odkładaniem Aβ [88]. Potwierdzają ją badania, w których zaobserwowano współistnienie złogów Aβ z antygenami *C. pneumoniae* [27]. Opisano dwie praw-

dopodobne drogi zakażenia OUN przez *C. pneumoniae*. Początkowo toczące się w drogach oddechowych zapalenie mogłoby szerzyć się drogą naczyń krwionośnych do mózgu poprzez zakażone monocyty przekraczające barierę krew-mózg [27, 96]. Według drugiej koncepcji zakażenie obejmujące początkowo błonę śluzową jamy nosowej szerzy się przez opuszkę węchową na struktury węchomózgowia [27]. W próbie leczenia przewlekłego, potwierdzonego badaniami serologicznymi, zakażenia *C. pneumoniae* u chorych na ChA, z zastosowaniem terapii skojarzonej doksycykliną i rifampicyną, uzyskano istotną statystycznie poprawę w zakresie funkcji poznawczych i codziennego funkcjonowania. Nie wykluczono jednak wpływu niepoznanych dotąd interakcji antybiotyków z Aβ na poprawę kliniczną leczonych pacjentów [51]. Nie zaobserwowano również związku między nasileniem procesów patologicznych toczących się w mózgowiu a obrazem klinicznym [27].

2.2. Wirus opryszczki pospolitej typu 1

Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1) jest jednym z lepiej poznanych czynników infekcyjnych w ChA. Początkowo zakażenie HSV-1 obejmuje nabłonek jamy ustnej, gdzie wirus namnaża się, prowadząc do lizy komórek gospodarza. Następnie drogą nerwu szczękowego i żuchwowego wirus przedostaje się do zwoju nerwu trójdzielnego, pozostając w stadium latencji do czasu aktywacji wywołanej czynnikami zewnętrznymi, np. chorobą, stresem, czy ekspozycją na promienie słoneczne [30]. HSV-1 może również prowadzić do zakażenia OUN, w wyniku którego w niektórych przypadkach obserwowane są zmiany histopatologiczne – głównie demielinizacja, która może odgrywać kluczową rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych [37]. Ryzyko infekcji HSV-1 w obrębie OUN narasta z wiekiem [75]. W badaniach przeprowadzonych na populacji niemieckiej częstość występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko HSV-1 w grupie wiekowej 16–18 lat wynosiła 57,3% i rosła wraz z wiekiem do 78,0% w grupie wiekowej 28–30 lat [86]. Wieloletnie obserwacje badawcze sugerują udział HSV-1 w agregacji Aβ i powstawania NFT prawdopodobnie za sprawą reakcji zapalnej wywołanej infekcją [90]. W okresie latencji HSV-1 nie nasila jednak reakcji immunologicznych, wręcz przeciwnie – hamuje proces apoptozy oraz reakcje dopełniacza, chroniąc tym samym komórki nerwowe przed zniszczeniem. Prawdopodobnie pojawienie się innego patogenu wywołującego zapalenie w obrębie OUN (np. *C. pneumoniae*, czy *Helicobacter pylori*) powoduje zaburzenie równowagi immunologicznej i wzmożoną reakcję zapalną [11]. Zarówno w strukturach Aβ, jak i NFT, wykazano obecność licznych białek biorących udział w przebiegu zakażenia HSV-1, w tym niemal wszystkie poznane receptory dla HSV-1, białka związane z endocytozą HSV-1, wewnątrznaczyniowym transportem oraz enzymy fosforylacyjne [11]. Obecność enzymów fosforylacyjnych w zakażonych komórkach nerwowych wyjaśnia zdolność HSV-1 do wywoływania specyficznej dla ChA fosforylacji białka Tau [98]. Niektórzy badacze wykazali istotnie wyższe ryzyko rozwoju ChA u pacjentów, u których stwierdzono równocześnie obecność allelu kodującego izoformę ε4 Apolipoproteiny E (ApoE4) oraz zakażenie HSV-1 [64, 90]. Przyczyną tego zjawiska może być mniejsza efektywność mechanizmów naprawczych u pacjentów z ApoE4, związana z upośledzonym transportem lipidów. Sprawia to, że u nosicieli allelu ApoE4 występuje większa skłonność do uszkodzeń neuronów w wyniku zakażania HSV-1 [90]. Ponadto obecność allelu ApoE4 sprzyja replikacji wirusa, prawdopodobnie poprzez umożliwianie przejścia HSV-1 w fazę lityczną cyklu komórkowego [90]. Jednak nie wszystkie badania potwierdzają znaczenie współistnienia infekcji HSV-1 z obecnością allelu kodującego ApoE4 [24]. Inne badania epidemiologiczne potwierdzają związek między wysokim poziomem przeciwciał klasy IgM przeciwko HSV-1, a obniżonym poziomem Aβ w osoczu. Nie wykazano jednak podobnej korelacji z przeciwciałami klasy IgG [24].

2.3. Krętki

Borrelia burgdorferi sensu stricto oraz inne krętki z rodzaju *Borellia*: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, oraz *B. bavariensis* są patogenami wywołującymi chorobę z Lyme, czyli boreliozę. W ostatnich latach obserwuje się zwiększoną zapadalność na tą chorobę w krajach europejskich [91]. W Polsce na przełomie lat 2009–2010 liczba zachorowań wzrosła o 20% [70]. Występuje znaczne zróżnicowanie geograficzne pod względem liczby zachorowań w różnych obszarach świata [17, 78]. Charakterystycznym pierwszym objawem zakażenia są zmiany skórne pod postacią rumienia wędrującego, rzadziej pojawiają się zapalenie stawów, wczesne objawy neurologiczne, limfocytoma, przewlekłe zanikowe zapalenie skóry kończyn, objawy kardiologiczne, czy późne objawy neurologiczne [91]. Neurologiczna manifestacja objawów zakażenia określana jest mianem neuroboreliozy z Lyme. Objawy neurologiczne pojawiają się kilka tygodni po infekcji, początkowo przebiegając pod postacią zapalenia w przestrzeni podpajęczynówkowej, rzadziej jako zaburzenia neuropsychiczne z klinicznie diagnozowaną demencją [22]. Według jednej z proponowanych koncepcji udziału *B. burgdorferi sensu lato* w indukcji zmian neurodegeneracyjnych, patogeny wnikając do neuronów powodują wewnątrzkomórkowy proces zapalny, w odpowiedzi na który dochodzi do nieprawidłowej fosforylacji białka Tau i zaburzenia układu mikrotubularnego komórek, demonstrujących się zmianami typu NFT [54]. Ten patologiczny proces, szerząc się transneuronalnie, obejmuje kolejne obszary mózgu,

prawdopodobnie poprzez zaburzenie hemostazy enzymatycznej [54]. Istotą udziału *B. burgdorferi* sensu lato w patogenezie ChA jest zatem przebyta neuroborelioza, w wyniku której u pacjentów z ChA obserwowane są antygeny *B. burgdorferi* w obszarach zmian typu NFT i Aβ. U pacjentów, którzy nigdy nie przebyli neuroboreliozy, powstawanie zmian neurodegeneracyjnych w OUN jest wywołane innymi czynnikami [60].

Inną bakterią z rodziny *Spirochaetaceae* biorącą udział w patogenezie ChA jest krętek blady, czyli *Treponema pallidum.* Z powodu skutecznej antybiotykoterapii *T. pallidum* jest obecnie stosunkowo rzadką przyczyną zakażeń, wciąż pozostając problemem w niektórych grupach społecznych [20, 76]. Wpływ zakażenia *T. pallidum* na funkcjonowanie OUN obserwowany jest od wieków, zakażenie to manifestuje się zaburzeniami funkcji poznawczych, w tym demencją, w okresie kiły objawowej później [32]. Zaburzenia kognitywne ulegają jednak częściowej poprawie po zastosowaniu skutecznego leczenia [58]. W badaniach za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI) u pacjentów z objawową kiłą układu nerwowego uwidaczniają się zmiany atroficzne w okolicy czołowo-skroniowej kory mózgu [39]. Zmiany w badaniach obrazowych mogą wynikać ze zdolności *T. pallidum* do indukcji reakcji zapalnej, głównie poprzez stymulację komórek do wydzielania cytokin prozapalnych, tj.: TNF-α, IL-1β i IL-6 [50]. Obraz kliniczny oraz zmiany zapalne w okolicach kory czołowej i hipokampu sugerują związek między zakażeniem *T. pallidum* a patogenezą ChA, który podobnie jak w przypadku *B. burgdorferi,* będzie wynikał z nasilonych procesów zapalnych prowadzących do zmian neurodegeneracyjnych – odkładnia złogów Aβ oraz powstawania NFT [60].

Poza *B. burgdorferi sensu lato* i *T. pallidum* opisano również inne krętki hipotetycznie zaangażowane w patogenezę ChA. Na szczególną uwagę zasługuje *Treponema denticola*, stanowiąca naturalną florę bakteryjną jamy ustnej, w niektórych przypadkach indukującą zapalenie przyzębia [23]. Prawdopodobne są dwie drogi przedostawania się tego patogenu z jamy ustnej do struktur mózgu. Po pierwsze proces zapalny w obrębie przyzębia może się uogólniać obejmując mózgowie drogą krążenia systemowego za pośrednictwem cytokin prozapalnych bez kontaktu bakterii ze strukturami mózgowymi. Drugi mechanizm zakłada przedostawanie się do OUN bakterii przyzębia, bądź molekuł pochodzenia bakteryjnego – poza *T. denticola*, opisano udział w tym mechanizmie także *Actinobacillus actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis* [38].

2.4. *Helicobacter pylori*

Zakażenie *Helicobacter pylori* dotyczy 10–30% populacji krajów rozwiniętych i 80–90% populacji krajów rozwijających się [10]. Mechanizm udziału zakażenia *H. pylori* w patogenezie ChA jest nie do końca jasny. Infekcja *H. pylori* jest ściśle związana z chorobami żołądka, a także w mniejszym stopniu z zaburzeniami spoza układu pokarmowego wynikającymi z dysfunkcji naczyń krwionośnych. Zaburzenia te mogą przyczyniać się do osłabienia bariery krew-mózg, co stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju choroby Alzheimera [44, 89]. Ponadto *H. pylori* stymulując nieprawidłowe reakcje immunologiczne, w tym molekularną mimikrę, może przyczyniać się do apoptozy komórek nerwowych [44]. Inna hipoteza zakłada rolę w neurodegeneracji wydzielanego przez *H. pylori* bogatego w histydynę białka Hpn, które przekraczając barierę krew-mózg bezpośrednio zwiększa gromadzenie Aβ [25]. W badaniach klinicznych na populacji europejskiej wykazano większą częstość infekcji *H. pylori* wśród pacjentów z ChA względem osób zdrowych potwierdzaną badaniami histopatologicznymi [45] oraz podwyższonym poziomem przeciwciał przeciwko *H. pylori* klasy IgG [56, 81] oraz IgA [56]. Równocześnie stwierdzono poprawę w zakresie funkcji poznawczych po skutecznym leczeniu eradykacyjnym [44]. Nie wykluczono jednak, że zwiększona częstość zakażeń wywołanych *H. pylori* wśród pacjentów z chorobą Alzheimera wynika z niskiego poziomu higieny wśród pacjentów z zaawansowaną demencją [81]. Podobne badania epidemiologiczne z użyciem testu ureazowego przeprowadzone w Japonii nie wykazały istotnych statystycznie różnic w zapadalności na infekcje *H. pylori* wśród pacjentów z ChA w porównaniu do osób zdrowych [89].

3. Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (ChP) jest heterogenną chorobą neurodegeneracyjną, której rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu klasycznych objawów: drżenia, akinezji, bądź bradykinezji, sztywności oraz niestabilnej postawy [18, 31]. Ryzyko zachorowania na ChP rośnie z wiekiem i jest większe wśród mężczyzn, zapadalność w wieku 75–85 lat wynosi 4,5–6,8 na 1000 osób [40]. W badaniach autopsyjnych u pacjentów z ChP stwierdza się utratę neuronów w obrębie części zbitej istoty czarnej, co prowadzi do nieprawidłowego przekaźnictwa dopaminergicznego w obrębie zwojów podstawnych [31]. Dokładna patogeneza ChP nie jest znana. Ostatnie doniesienia wskazują na udział procesów autoimmunologicznych w etiopatogenezie ChP. Wśród pacjentów z ChP względem grupy kontrolnej wykazano większą częstość występowania trzech rodzajów autoprzeciwciał skierowanych przeciw lizatowi mózgu (anty-brain lysate), przeciw dwuniciowemu DNA (DsDNA) oraz przeciw komórkom nerwowym, a także korelację między manifestacją objawów klinicznych a obecnością tych przeciwciał [4].

3.1. Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS)

Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS) jest jednostką chorobową wywołaną wirusem zespołu nabytego niedoboru odporności (HIV), należącego do rodziny *Retroviridae* [1]. W Polsce odnotowano nieznaczny wzrost zapadalności na AIDS w latach 2005–2007 oraz znaczny wzrost liczby osób chorujących na AIDS w latach 2001–2007 [80]. Przyczyną takiej sytuacji epidemiologicznej jest wydłużenie średniego czasu przeżycia pacjentów zakażonych HIV, wynikające z poprawy skuteczności leczenia za sprawą wprowadzenia intensywnego leczenia antyretrowirusowego [42]. Z porównania ryzyka pojawienia się zaburzeń funkcji poznawczych u chorujących na AIDS względem populacji ogólnej w okresach przed i po wprowadzeniu tej terapii, wynika, że częstość wystąpienia zaburzeń kognitywnych znacznie wzrosła w okresie zintensyfikowanego leczenia [49]. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że wraz z postępem choroby izolowane efekty deficytów poznawczych, np. wydłużony czas reakcji, ewoluują w pełny obraz kliniczny chorób neurologicznych, np. zespołu Parkinsona, z typowymi objawami: bradyfrenią, zaburzeniami afektu, spowolnieniem psychomotorycznym, bradykinezją, niestabilnością postawy, nieprawidłowościami chodu, zaburzeniami motoryki oczu, hipomimią, czy łojotokowym zapaleniem skóry [47]. Przyczyną takiego przebiegu zakażania HIV są zmiany neurodegeneracyjne OUN. W badaniu MRI wykazano większą liczbę obszarów hipoechogenicznych w obrębie istoty czarnej u pacjentów zakażonych HIV w porównaniu do osób zdrowych [68]. Wielkość obszarów hipoechogenicznych koreluje ujemnie ze stężeniem dopaminy w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) oraz dodatnio z poziomem zaawansowania deficytów neurologicznych w zakresie zdolności do kierowania pojazdem i szybkości psychomotorycznej [68]. W innym badaniu stwierdzono związek między nasileniem objawów motorycznych i behawioralnych typowych dla zespołu Parkinsona a obustronną atrofią w obrębie jąder podstawy [48]. Mechanizm uszkodzenia komórek nerwowych OUN przez wirusa HIV prowadzącego do pojawienia się objawów neurologicznych nie jest znany. Dotychczasowe badania podkreślają rolę w tym procesie transaktywacyjnego białka Tat oraz białka powierzchniowego otoczki HIV – glikoproteiny 120 (gp120). Białko Tat wywołuje apoptozę neuronów, a także hamuje wzrost, proliferację i różnicowanie nerwowych komórek macierzystych, wpływając negatywnie na neurogenezę [62]. Natomiast eksperymentalne podanie gp120 szczurom powoduje u nich uszkodzenie komórek nerwowych za pośrednictwem receptorów błonowych NMDA i receptora dla chemokin CXCR4. Równoczesne podanie antagonistów CXCR4 z gp120 powoduje efekt neuroprotekcyjny, jednak podobnych wyników nie uzyskano dla antagonistów NMDA [100]. Innym mechanizmem neurodegeneracyjnym wywołanym przez gp120 w ostrym i przewlekłym zakażeniu HIV jest uszkodzenie bariery krew-mózg spowodowane nadmierną aktywacją receptorów NMDA i wtórnym powstawaniem reaktywnych form tlenu. Wykazano skuteczność antagonistów NMDA i leków antyoksydacyjnych w zapobieganiu uszkodzeniom bariery krew-mózg [52]. Dotychczasowe obserwacje wskazują na nieskuteczność leczenia antyretrowirusowego w zapobieganiu powikłaniom neurologicznym prawdopodobnie z powodu wnikania wirusa do neuronów we wczesnym etapie zakażenia przed podjęciem skutecznego leczenia [62].

3.2. *Toxoplasma gondii*

Zakażenie mózgu *Toxoplasma gondii* jest stosunkowo częstym zakażeniem wśród pacjentów z AIDS, z tego powodu zostało ujęte w kategorii C definicji AIDS, jako jedno z zakażeń oportunistycznych [1]. Jedynie nieliczne doniesienia wskazują na udział *T. gondii* w etiopatogenezie zespołu Parkinsona wśród osób nie chorujących na AIDS. Porównanie liczby osób z specyficznymi przeciwciałami klasy IgG przeciw *T. gondii* wśród osób chorujących na zespół Parkinsona w porównaniu do osób zdrowych wykazało istotną statystycznie różnicę. Prawdopodobnie *T. gondii* inicjując proces zapalny może wywołać zmiany neurodegeneracyjne [61]. Wiadomo, że *T. gondii* w fazie ostrej zakażenia powoduje aktywację komórek dendrytycznych i mikrogleju [36], następnie migrację limfocytów T, chroniących komórki nerwowe przed zniszczeniem i w ten sposób infekcja przechodzi w postać przewlekłą [43]. U pacjentów zakażonych HIV z powodu zaburzeń w układzie odporności dochodzi do reaktywacji dawnego zakażenia [43]. Postać przewlekła toksoplazmozy predysponująca do aktywnej, objawowej choroby u pacjentów z AIDS, jest stosunkowo częsta. W Polsce wśród leśników, częstość występowania chronicznej toksoplazmozy, stwierdzanej na podstawie obecności przeciwciał klasy IgG, oszacowano na 62,5% [33]. Typowa lokalizacja cyst *T. gondii* to jądra podstawy, z czego wynikają charakterystyczne dla zespołu Parkinsona objawy, tj.: drżenie, hemibalizm, parkinsonizm i sztywność [65].

4. Stwardnienie rozsiane

Stwardnienie rozsiane (multiple sclerosis – MS) jest nabytą przewlekłą autoimmunologiczną chorobą demielinizacyjną ośrodkowego układu nerwowego, niemal dwukrotnie częściej występującą wśród kobiet [87]. Badania epidemiologiczne na świecie pokazują, że MS wykazuje ogniskowo zwiększoną zapadalność, najprawdopodobniej w rezultacie działania jak dotąd

niepoznanych dokładnie czynników środowiskowych [28, 73]. W świetle tych obserwacji w ostatnich latach zaczyna przeważać pogląd, że czynniki środowiskowe, w tym infekcje, pełnią większą rolę niż czynniki genetyczne w etiopatogenezie MS i mogą stanowić ponad 75% przyczyn MS [93]. Ponadto wskazuje się raczej na polietiologię MS; jeden z proponowanych modeli patogenezy MS zakłada współudział czynników infekcyjnych z niedoborem witaminy D oraz ze specyficznym haplotypem MHC – HLA-DRB1 [84]. Analizy ognisk epidemicznych MS potwierdzają większą chorobowość na obszarach o mniejszej ekspozycji na promienie UV. Co ciekawe u pacjentów z MS wykryto niższe poziomy witaminy D w osoczu w porównaniu do osób zdrowych. Prawdopodobnie witamina D pełni rolę immunomodulacyjną w OUN, a mediatorem tego procesu mogą być limfocyty T [34]. Badanie retrospektywne, analizujące zbieżność zaostrzeń MS ze wzrostem zachorowalności na choroby wywołane najczęstszymi wirusami chorobotwórczymi, wykazało wyraźny związek zachorowań z epidemiami wywołanymi przez wirus Epsteina-Barr oraz influenza A, natomiast brak korelacji z adenowirusami [69]. Alternatywnie do polietiologicznego infekcyjnego modelu patogenezy pojawił się pogląd zgodny z teorią higieniczną. Według teorii higienicznej brak stymulacji układu immunologicznego przez czynniki środowiskowe sprzyja rozwojowi chorób autoimmunologicznych. W patogenezie MS szczególnie korzystny wpływ miałyby odgrywać przebyte zakażenia pasożytnicze [79]. Jednak ta koncepcja w przypadku MS nie jest poparta zbyt licznymi dowodami. W indukcji stwardnienia rozsianego wiele prac poświęcono mimikrze molekularnej, wywołanej zakażeniem różnymi drobnoustrojami, poza opisanymi poniżej, prawdopodobnie mogą to być również *Mycobacterium tubreculosis* [14], *H. pylori* [46], *Cytomegalowirus* [72], czy *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [16].

4.1. Wirus Epsteina-Barr

Wirus Epsteina-Barr (EBV) jest wirusem DNA z rodziny *Herpesviridae* rozpowszechnionym na całym świecie, z częstością występowania przekraczającą 90% populacji. Do pierwotnej infekcji dochodzi najczęściej w wieku przedszkolnym lub młodzieńczym, wówczas przebiega ona pod postacią mononukleozy zakaźnej lub bezobjawowej [6]. Wirus wnikając do organizmu gospodarza wykazuje powinowactwo do limfocytów B, łącząc się z receptorem CD21 na ich powierzchni [55]. Bez względu na postać zakażenia informacja genetyczna wirusa w postaci episomu jest przechowywana w limfocytach B gospodarza do końca życia [6]. Ryzyko zachorowania na MS zwiększa się 2–3-krotnie u pacjentów, u których infekcja EBV przebiegała pod postacią mononukleozy zakaźnej, natomiast jest znacznie niższa u osób, które nigdy nie przebyły zakażenia EBV [7]. Zakażenie EBV jest wykrywane znacznie częściej u pacjentów chorujących na MS w porównaniu do osób zdrowych, ponadto u tych pacjentów częściej stwierdza się koinfekcję EBV typu 1 oraz typu 2 [85]. Na podstawie obszernego badania prospektywnego wytypowano białka EBV, mogące stanowić markery MS wykrywalne na pięć lub więcej lat przed pojawieniem się pierwszych objawów neurologicznych. Obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko antygenowi EBNAc związana jest z 30-krotnym wzrostem ryzyka zachorowania na MS, natomiast obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko antygenowi EBNA-1 z 7-krotnym wzrostem ryzyka [63]. Jednak nie wszystkie badania potwierdzają zwiększoną częstość zakażeń EBV u pacjentów z MS [55]. Rola EBV w patogenezie MS wciąż nie jest wyjaśniona, dotychczasowe badania szeroko opisują interakcje wirusa z komórkami układu odpornościowego [55]. Początkowo sądzono, że EBV może brać udział w patogenezie MS na drodze molekularnej mimikry, jednak dalsze obserwacje, szczególnie potwierdzenie przewagi udziału limfocytów B nad limfocytami T w procesach stymulowanych przez EBV, spowodowały odrzucenie tej hipotezy [53]. Wiele wskazuje na to, że zakażenie EBV prowadzi do uszkodzenia bariery krew-mózg i w ten sposób może modulować procesy neurodegeneracyjne. Udowodniono, że EBV może zainfekować komórki śródbłonka mikronaczyń, powodując w ten sposób zwiększone wydzielanie czynników prozapalnych oraz aktywację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, a w konsekwencji lokalne uszkodzenia bariery krew-mózg [13]. Uwzględniając dotychczasową wiedzę na temat patofizjologii zakażenia EBV, należy podkreślić szczególną rolę limfocytów B. W jednym z nowszych badań między pacjentami z MS i grupą kontrolną wykazano różnicę w ekspresji cząsteczki CD21, stanowiącej receptor dla EBV. W surowicy pacjentów z MS stwierdzono niższe stężenie rozpuszczalnego receptora CD21, poziom ten był jeszcze niższy u pacjentów leczonych beta-interferonem. Nie potwierdzono podłoża genetycznego tych różnic – znaleziono jedynie dwa polimorfizmy nukleotydowe w eksonach kodujących cząsteczkę CD21, ale nie miały one związku z występowaniem MS. W rezultacie nie znaleziono również istotnego związku między stężeniem receptora CD21 a patogenezą MS. [94].

4.2. Wirus Torque teno

Wirus Torque teno (TTV) został odkryty w 1997 roku u pacjentów z potransfuzyjnym zapaleniem wątroby o nieznanej etiologii [66]. Zgodnie z aktualnymi poglądami wirus ten może mieć związek z chorobami wątroby, zaburzeniami hematologicznymi, chorobami płuc oraz immunologicznymi [35]. W badaniu populacyjnym

wśród pracowników służby zdrowia TTV występował z częstością 70,3% [19]; jego obecność stwierdzono również u zwierząt [35]. Potwierdzono także, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej mogą stanowić rezerwuar dla TTV [19]. Znaczenie wirusa TTV w etiopatogenezie MS przedstawiono w modelu koinfekcji ESV i TTV. Według przedstawionej hipotezy zakażanie wirusem TTV uprzednio zainfekowanych przez EBV limfocytów B, sprzyja jego replikacji. Równocześnie zakażenie tych komórek przez TTV spowoduje spontaniczną aktywację cyklu litycznego EBV. Potencjalnym czynnikiem zwiększającym indeks replikacji TTV jest białko EBNA-1, jednak ten mechanizm, jak i cały model koinfekcji w patogenezie MS, wymaga dalszych badań [7].

4.3. Ludzki Herpeswirus typu 6

Ludzki Herpeswirus typu 6 (HHV-6), nazywany niekiedy wirusem rumienia nagłego, należy do rodziny *Herpesviridae,* w populacji ogólnej występuje z częstością 80,4% [82]. Pierwsze zakażenie HHV-6 pojawia się najczęściej w wieku 2 lat, towarzyszą mu niespecyficzne objawy. W wieku dorosłym HHV-6 najczęściej spotykany jest jako infekcja współistniejąca z AIDS, po przeszczepie szpiku kostnego oraz w innych przeszczepionych narządach, bądź w chorobach OUN [12]. Potencjalną drogą przedostawania się HHV-6 do mózgu jest opuszka węchowa. Dowodzą tego autopsyjne badania błony śluzowej jamy nosowej oraz tkanek z wybranych okolic mózgowia. Struktury najbardziej związane z drogą węchową, tj. wzgórze, hipokamp i ciało migdałowate, stanowią najczęściej zajęte przez HHV-6 struktury w obrębie mózgowia, jednak nie wykazano różnicy między częstością występowania HHV-6 w tych okolicach w próbkach pobranych od pacjentów z MS w porównaniu do osób nie chorujących na choroby neurologiczne [29]. Szczególne znaczenie w szerzeniu się zakażenia HHV-6 na struktury węchomózgowia, a w związku z tym również i w patogenezie MS, mogą pełnić glejowe komórki węchowe. Zakażenie tych komórek stwierdzono w badaniu autopsyjnym, ale tych obserwacji nie udało się powtórzyć *in vitro* [29]. Obszerna metaanaliza obejmująca publikacje sprzed 2010 r. badające związek MS z obecnością infekcji HHV-6 wykazała liczne błędy metodologiczne uniemożliwiające jednoznaczne określenie, czy faktyczne HHV-6 jest zaangażowany w patogenezę MS. Ostatecznie opisano 25 badań, które uzyskały statystycznie istotną różnicę w częstości występowania HHV-6 między pacjentami z MS a osobami zdrowymi. Posłużono się w nich następującymi metodami: oceną poziomu przeciwciał klasy IgG oraz IgM przeciwko HHV-6 w surowicy, w populacjach komórkowych (najczęściej jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej) i w PMR, oraz badaniami sekcyjnymi próbek mózgu z użyciem metody PCR i badaniami immunohistochemicznymi, a także szybkim oznaczaniem w hodowlach komórkowych (rapid culture assay). W szybkim oznaczaniu w hodowlach komórkowych, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej pobrane od pacjentów inkubowano w hodowlach komórkowych, następnie oznaczano obecność antygenów HHV-6 w hodowli, pozytywne wyniki było równoznaczne z obecnością aktywnego zakażenia u przebadanych pacjentów. Autorzy wskazując na błędy metodyczne podkreślili przewagę badania PMR nad badaniem surowicy oraz wysoką skuteczność oceny aktywnego zakażania za pomocą metody szybkiego oznaczania w hodowlach komórkowych. Według autorów metaanalizy stwierdzenie aktywnego zakażenia ma największą wartość w badaniu związku między drobnoustrojami a indukcją chorób neurodegeneracyjnych. Jednak w badaniu nad HHV-6 tylko w jednym badaniu stwierdzono częstsze zakażenie u pacjentów z MS w porównaniu do osób zdrowych, diagnozowane za pomocą metody szybkiego oznaczania w hodowlach komórkowych. Ujemne wyniki badań opartych na metodzie PCR mogą wynikać ze zbyt małej czułości metody w wykrywaniu niskich stężeń wirusowego DNA [67]. Opisane powyżej trudności metodologiczne napotykane przez badaczy oraz wynikające z nich błędy metodyczne sprawiają, że wyciąganie wniosków jest obarczone dużym błędem, na przykład z prac badawczych, w których uzyskane wyniki wskazują na przebyte zakażenie, a są interpretowane, jako obecność aktywnego zakażenia. Klasycznym przykładem tego rodzaju nadinterpretacji wyników jest utrzymywanie się wysokiego stężenia przeciwciał klasy IgM, których obecność w OUN może być rezultatem przekroczenia przez HHV-6 bariery krew-mózg w przebiegu zakażania systemowego, czy reaktywacji albo zaostrzenia infekcji, a nie obecności aktywnego zakażenia [97]. Istnieją jednak przesłanki pozwalające sądzić, że HHV-6 może być istotnym czynnikiem inicjującym lub zaostrzającym przebieg MS. Powiązanie HHV-6 z chorobami OUN nie jest bezzasadne, po pierwsze dlatego, że patogen ten wykazuje neurotropizm. Ponadto jego zakażanie wiąże się z podwyższeniem miana czynników zapalnych, prawdopodobnie spowodowanym aktywacją limfocytów Th1, co może wpływać na przebieg MS [67]. Wszystko to sprawia, że HHV-6 wciąż pozostaje w kręgu patogenów mogących uczestniczyć w patogenezie MS, jednak jego dokładana rola w przebiegu tej choroby wciąż pozostaje nieznana.

4.4. *Chlamydophila pneumoniae*

Istnieją przesłanki o potencjalnej roli *C. pneumoniae* w patogenezie ChA, kolejne odkrycia związane z rolą *C. pneumoniae* w zakażeniu OUN zapoczątkowały badania nad znaczeniem tej bakterii w patogenezie MS.

Dowiedziono, że u pacjentów z MS w porównaniu do osób chorujących na inne choroby neurologiczne oraz osób zdrowych częściej występuje zakażenie *C. pneumoniae* (15% vs. 5% [71]; 56,1% vs. 28,6% [21]). W badaniach stosowano metody oznaczenia przeciwciał klasy IgG oraz IgA przeciwko *C. pneumoniae*, a także kompleksów immunologicznych z *C. pneumoniae*, dzięki czemu stwierdzono obecność aktywnego zakażenia. Na tej podstawie badacze wysunęli hipotezę, że wczesne leczenie zakażenia *C. pneumoniae* u pacjentów z MS może przynieść kliniczną poprawę [71]. Jednak nie wszystkim badaczom udało się uzyskać istotną statystycznie różnicę w częstości występowania *C. pneumoniae* między pacjentami z MS i osobami zdrowymi [2, 15]. Wówczas pojawiły się argumenty za różnym znaczeniem tego drobnoustroju w dwóch klinicznych postaciach MS. Dowiedziono większą częstość występowania *C. pneumoniae* u pacjentów z wtórnie postępującym przebiegiem choroby, a mniejszą w przebiegu nawracająco-zwalniającym [21], te obserwacje nie rozstrzygają jednak, jaką faktycznie rolę może odgrywać ten patogen w inicjacji, bądź zaostrzaniu przebiegu MS [2]. Podobnie, jak i w badaniach nad HHV-6, zwrócono uwagę na zbyt niską czułość niektórych metod badawczych, np. PCR, która może fałszować wyniki [15, 92]. Porównanie wyników badań wykonywanych na różnym materiale – PMR i surowicy, nie wykazało przewagi żadnego z nich [21]. Natomiast wykrywanie wewnątrzpłynowego wytwarzania przeciwciał okazuje się być nieswoiste i nieczułe względem zakażenia *C. pneumoniae* u pacjentów z MS, stwierdzono je jedynie w kilku przypadkach, podobne wyniki uzyskując w innych chorobach zapalnych OUN. Negatywne wyniki mogą świadczyć o braku związku tego patogenu z MS, ale mogą także być konsekwencją niskiej czułości i swoistości metody. Kolejne badania powinny rozstrzygnąć, czy *C. pneumoniae* może stanowić czynnik sprawczy MS, np. na drodze mimikry molekularnej [21].

5. Podsumowanie

Dotychczas opisano wiele drobnoustrojów prawdopodobnie związanych z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych, wciąż jednak niewiele wiadomo o tym, jaką rolę odgrywają w powstawaniu, czy też zaostrzaniu przebiegu tych chorób. Patogeny prawdopodobnie pełnią rolę czynnika spustowego mechanizmów immunologicznych, zapoczątkowujących procesy neurodegeneracyjne. Nadal jednak nie wiadomo, które mechanizmy immunologiczne odgrywają kluczową rolę w poszczególnych chorobach neurodegeneracyjnych. Obecnie wydaje się, że szczególne znaczenie w indukcji tych chorób mogą odgrywać drobnoustroje wykazujące neurotropizm. Warto jednak zwrócić uwagę na koncepcję rozprzestrzeniania się procesu zapalnego na OUN, opisanego jako jeden z mechanizmów uogólniania się zapalenia przyzębia wywołanego przez *T. denticola*. Mediatorem tej drogi szerzenia się zapalenia są czynniki prozapalne, głównie interleukiny [38]. Wzrost miana interleukin stwierdza się także w innych zapaleniach, m.in. wirusowych [26], więc nie wykluczone, że również inne drobnoustroje mogą odgrywać rolę w indukcji chorób neurodegeneracyjnych na tej drodze. Kolejne badania powinny odpowiedzieć na pytania, czy drobnoustroje stanowią czynnik sprawczy, bądź modyfikujący przebieg chorób neurodegeneracyjnych, czy też towarzyszą tym chorobom ze zwiększoną częstością w porównaniu do osób zdrowych. Wymaga to jednak ujednolicenia i poprawy metodyki badań.

Piśmiennictwo

1. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR*, **18**, 1–19 (1992)
2. Aghaei M., Ashtari F., Bahar M., Falahian M.R.: Chlamydia pneumoniae seropositivity in Iranian patients with multiple sclerosis: a pilot study. *Neurol. Neurochir. Pol.* **45**, 128–131 (2011)
3. Balin B.J., Gérard H.C., Arking E.J., Appelt D.M., Branigan P.J., Abrams J.T., Whittum-Hudson J.A., Hudson A.P.: Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 23–42 (1998)
4. Benkler M., Agmon-Levin N., Hassin-Baer S., Cohen O.S., Ortega-Hernandez O.D., Levy A., Moscavitch S.D., Szyper-Kravitz M., Damianovich M., Blank M., Chapman J., Shoenfeld Y.: Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* **42**, 164–171 (2012)
5. Blasi F., Tarsia P., Aliberti S.: Chlamydophila pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 29–35 (2009)
6. Bocian J., Januszkiewicz-Lewandowska D.: Epstein-Barr virus infection – life cycle, methods of diagnosis, associated diseases. *Post. Hig. Med. Dośw.* (*Online*), **65**, 286–298 (2011)
7. Borkosky S.S., Whitley C., Kopp-Schneider A., zur Hausen H., Devilliers E.M.: Epstein-Barr virus stimulates torque teno virus replication: a possible relationship to multiple sclerosis. *PLoS One*, **7**, e32160 (2012)
8. Breitner J.C.: The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **47**, 401–411 (1996)
9. Brown R.C., Lockwood A.H., Sonawane B.R.: Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ. Health. Perspect.* **113**, 1250–1256 (2005)
10. Bures J., Kopácová M., Skodová Fendrichová M., Rejchrt S.: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Vnitr. Lek.* **57**, 993–999 (2011)
11. Carter C.J.: Alzheimer's disease plaques and tangles: cemeteries of a pyrrhic victory of the immune defence network against herpes simplex infection at the expense of complement and inflammation-mediated neuronal destruction. *Neurochem. Int.* **58**, 301–320 (2011)
12. Caserta M.T., Mock D.J., Dewhurst S.: Human herpesvirus 6. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 829–833 (2001)
13. Casiraghi C., Dorovini-Zis K., Horwitz M.S.: Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **230**, 173–177 (2011)

14. Chodisetti S.B., Rai P.K., Gowthaman U., Pahari S., Agrewala J.N.: Potential T cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis that can instigate molecular mimicry against host: implications in autoimmune pathogenesis. *BMC Immunol.* **13**, 13 (2012)
15. Contini C., Seraceni S., Cultrera R., Castellazzi M., Granieri E., Fainardi E.: Chlamydophila pneumoniae infection and its role in neurological disorders. Interdiscip. *Perspect. Infect. Dis*. **2010,** 1–19 (2010)
16. Cossu D., Cocco E., Paccagnini D., Masala S., Ahmed N., Frau J., Marrosu M.G., Sechi L.A.: Association of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with multiple sclerosis in Sardinian patients. *PLoS One,* **13**, e18482 (2011)
17. Diuk-Wasser M.A., Hoen A.G., Cislo P., Brinkerhoff R., Hamer S.A., Rowland M., Cortinas R., Vourc'h G., Melton F., Hickling G.J., Tsao J.I., Bunikis J., Barbour A.G., Kitron U., Piesman J., Fish D.: Human risk of infection with Borrelia burgdorferi, the Lyme disease agent, in eastern United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 320–327 (2012)
18. Dahodwala N., Siderowf A., Baumgarten M., Abrams A., Karlawish J.: Screening questionnaires for parkinsonism: a systematic review. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18**, 216–224 (2012)
19. Dencs A., Hettmann A., Szomor K.N., Kis Z., Takács M.: Prevalence and genotyping of group 3 torque teno viruses detected in health care workers in Hungary. *Virus Genes*, **39**, 39–45 (2009)
20. Dos Ramos Farías M.S., Avila M.M. i wsp.: First report on sexually transmitted infections among trans (male to female transvestites, transsexuals, or transgender) and male sex workers in Argentina: high HIV, HPV, HBV, and syphilis prevalence. *Int. J. Infect. Dis.* **15**, 635–640 (2011)
21. Fainardi E., Castellazzi M., Tamborino C., Seraceni S., Tola M.R., Granieri E., Contini C.: Chlamydia pneumoniae--specific intrathecal oligoclonal antibody response is predominantly detected in a subset of multiple sclerosis patients with progressive forms. *J. Neurovirol.* **15**, 425–433 (2009)
22. Fallon B.A., Levin E.S., Schweitzer P.J., Hardesty D.: Inflammation and central nervous system Lyme disease. *Neurobiol. Dis.* **37**, 534–541 (2010)
23. Fenno J.C.: Treponema denticola interactions with host proteins. *J. Oral Microbiol.* **4**, doi: 10.3402/jom.v4i0.9929 (2012)
24. Féart C., Dartigues J.F. i wsp.: Association between IgM anti--herpes simplex virus and plasma amyloid-beta levels. *PLoS One,* **6**, e29480 (2011)
25. Ge R., Sun X.: The in vivo functions of a histidine-rich protein Hpn in Helicobacter pylori: Linking gastric and Alzheimer's diseases together? *Med. Hypotheses*, **77**, 788–90 (2011)
26. Grześk E., Kołtan S., Dębski R., Wysocki M., Gruszka M., Kubicka M., Kołtan A., Grześk G., Manysiak S., Odrowąż-Sypniewska G.: Concentrations of IL-15, IL-18, IFN-γ and activity of CD4+, CD8+ and NK cells at admission in children with viral bronchiolitis. *Exp. Therapeutic Med.* **1**, 873–877 (2010)
27. Hammond C.J., Hallock L.R., Howanski R.J., Appelt D.M., Little C.S., Balin B.J.: Immunohistological detection of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's disease brain. *BMC Neurosci.* **11**, 121 (2010)
28. Handel A.E., Jarvis L., McLaughlin R., Fries A., Ebers G.C., Ramagopalan S.V.: The epidemiology of multiple sclerosis in Scotland: inferences from hospital admissions. *PLoS One,* **27**, e14606 (2011)
29. Harberts E., Yao K., Wohler J.E., Maric D., Ohayon J., Henkin R., Jacobson S.: Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **16**, 13734–13739 (2011)
30. Held K., Derfuss T.: Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia-current overview. *J. Neurovirol.* **17**, 518–527 (2011)
31. Helmich R.C., Hallett M., Deuschl G., Toni I., Bloem B.R.: Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits? *Brain,* **2012**, doi: 10.1093/brain/aws023 (2012)
32. Ho E.L., Lukehart S.A.: Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J. Clin. Invest.* **121**, 4584–4592 (2011)
33. Holec-Gasior L., Stańczak J., Myjak P., Kur J.: Occurrence of Toxoplasma gondii specific antibodies in group of forestry workers from pomorskie and warmińsko-mazurskie provinces. *Wiad. Parazytol.* **54**, 231–236 (2008)
34. Jankosky C., Deussing E., Gibson R.L., Haverkos H.W.: Viruses and vitamin D in the etiology of type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. *Virus. Res.* **163**, 424–430 (2012)
35. Jarosova V., Pogranichniy R., Celer V.: Prevalence and age distribution of porcine torque teno sus virus (TTSuV) in the Czech Republic. *Folia Microbiol.* **56**, 90–94 (2011)
36. John B., Ricart B, Tait Wojno E.D., Harris T.H., Randall L.M., Christian D.A., Gregg B., De Almeida D.M., Weninger W., Hammer D.A. i wsp.: Analysis of behavior and trafficking of dendritic cells within the brain during toxoplasmic encephalitis. *PLoS Pathog.* **7**, e1002246 (2011)
37. Kastrukoff L.F., Lau A.S., Thomas E.A.: The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae,* **3**, doi:10.1186/2042-4280-3-4 (2012)
38. Kamer A.R., Dasanayake A.P., Craig R.G., Glodzik-Sobanska L., Bry M., de Leon M.J.: Alzheimer's disease and peripheral infections: the possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis. *J. Alzheimers Dis.* **13**, 437–449 (2008)
39. Kayal A.K., Goswami M., Das M., Paul B.: Clinical spectrum of neurosyphilis in North East India. *Neurol. India*, **59**, 344–350 (2011)
40. Khandhar S.M., Marks W.J.: Epidemiology of Parkinson's disease. *Dis Mon.* **53**, 200–205 (2007)
41. Kiejna A., Frydecka D., Biecek P., Adamowski T.: Epidemiologia zaburzeń otępiennych w Polsce – przegląd badań. *Post. Nauk Med.* **8**, 676–681 (2011)
42. Kilmarx P.H.: Global epidemiology of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS.* **4**, 240–246 (2009)
43. Körner H., McMorran B., Schlüter D., Fromm P.: The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int. J. Parasitol.* **40**, 879–888 (2010)
44. Kountouras J., Gavalas E., Zavos C., Stergiopoulos C., Chatzopoulos D., Kapetanakis N., Gisakis D.: Alzheimer's disease and Helicobacter pylori infection: Defective immune regulation and apoptosis as proposed common links. *Med. Hypotheses*, **68**, 378–388 (2007)
45. Kountouras J., Boziki M., Gavalas E., Zavos C., Grigoriadis N., Deretzi G., Tzilves D., Katsinelos P., Tsolaki M., Chatzopoulos D., Venizelos I.: Eradication of Helicobacter pylori may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **256**, 758–767 (2009)
46. Kountouras J., Zavos C., Deretzi G., Gavalas E., Chatzopoulos D., Katsinelos P., Tsiaousi E., Gagalis S., Polyzos S.A., Venizelos I.: Potential implications of Helicobacter pylori-related neutrophil-activating protein. *World J. Gastroenterol.* **18**, 489–490 (2012)
47. Koutsilieri E., Sopper S., Scheller C., ter Meulen V., Riederer P.: Parkinsonism in HIV dementia. *J. Neural. Transm*. **109**, 767–775 (2002)
48. Küper M., Rabe K., Esser S., Gizewski E.R., Husstedt I.W., Maschke M., Obermann M.: Structural gray and white matter changes in patients with HIV. *J. Neurol.* **258**, 1066–1075 (2011)
49. Lescure F.X., Omland L.H., Engsig F.N., Roed C., Gerstoft J., Pialoux G., Kronborg G., Larsen C.S., Obel N.: Incidence and

impact on mortality of severe neurocognitive disorders in persons with and without HIV infection: a Danish nationwide cohort study. *Clin. Infect. Dis*. **52**, 235–243 (2011)
50. Liu S., Wang S., Wu Y., Zhao F., Zeng T., Zhang Y., Zhang Q., Gao D.: Production of proinflammatory cytokines in the human THP-1 monocyte cell line following induction by Tp0751, a recombinant protein of Treponema pallidum. *Sci. China Life Sci.* **53**, 229–233 (2010)
51. Loeb M.B., Molloy D.W., Smieja M., Standish T., Goldsmith C.H., Mahony J., Smith S., Borrie M., Decoteau E., Davidson W., McDougall A., Gnarpe J., O'DONNell M., Chernesky M.: A Randomized, Controlled Trial of Doxycycline and Rifampin for Patients with Alzheimer's Disease. *J. Am. Geriatr. Soc*. **52**, 381–387 (2004)
52. Louboutin J.P., Strayer D.S.: Blood-Brain Barrier Abnormalities Caused by HIV-1 gp120: Mechanistic and Therapeutic Implications. *Sci. World J.* **2012**, 482575 (2012)
53. Lucas R.M., Hughes A.M., Lay M.L., Ponsonby A.L., Dwyer D.E., Taylor B.V., Pender M.P.: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* **82**, 1142–1148 (2011)
54. MacDonald A.B.: Alzheimer's neuroborreliosis with trans--synaptic spread of infection and neurofibrillary tangles derived from intraneuronal spirochetes. *Med. Hypotheses*, **68**, 822–825 (2007)
55. Maghzi A.H., Marta M., Bosca I., Etemadifar M., Dobson R., Maggiore C., Giovannoni G., Meier U.C.: Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? *Pathophysiology,* **18**, 13–20 (2011)
56. Malaguarnera M., Bella R., Alagona G., Ferri R., Carnemolla A., Pennisi G.: Helicobacter pylori and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur. J. Intern. Med*. **15**, 381–386 (2004)
57. McKhann G.M., Phelps C.H. i wsp.: The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **7**, 263–269 (2011)
58. Mehrabian S., Raycheva M.R., Petrova E.P., Tsankov N.K., Traykov L.D.: Neurosyphilis presenting with dementia, chronic chorioretinitis and adverse reactions to treatment: a case report. *Cases. J.* **2**, 8334 (2009)
59. Mella, Hugo M.D.; Katz.: Neurosyphilis As An Etiological Factor in the Parkinsonian Syndrome. *J. Nervous* and *Mental Disease*, **59**, 225–230 (1924)
60. Miklossy J.: Alzheimer's disease – a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. *J. Neuroinflammation,* **8**, 90 (2011)
61. Miman O., Kusbeci O.Y., Aktepe O.C, Cetinkaya Z.: The probable relation between Toxoplasma gondii and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **475**, 129–131 (2010)
62. Mishra M., Taneja M., Malik S., Khalique H., Seth P.: Human immunodeficiency virus type 1 Tat modulates proliferation and differentiation of human neural precursor cells: implication in Neuro AIDS. *J. Neurovirol.* **16**, 355–367 (2010)
63. Munger K.L., Levin L.I., O'Reilly E.J., Falk K.I., Ascherio A.: Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult. Scler.* **17**, 1185–1193 (2011)
64. Namboori P.K., Vineeth K.V., Rohith V., Hassan I., Sekhar L., Sekhar A., Nidheesh M.: The ApoE gene of Alzheimer's disease (AD). *Funct. Integr. Genomics,* **11**, 519–522 (2011)
65. Nath A., Sinai A.P.: Cerebral Toxoplasmosis. *Curr. Treat. Options Neurol.* **5**, 3–12 (2003)
66. Nishizawa T., Okamoto H., Konishi K., Yoshizawa H., Miyakawa Y., Mayumi M.: A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 92–97 (1997)
67. Nora-Krukle Z., Chapenko S., Logina I., Millers A., Platkajis A., Murovska M.: Human herpesvirus 6 and 7 reactivation and disease activity in multiple sclerosis. *Medicina,* **47**, 527–531 (2011)
68. Obermann M., Küper M., Kastrup O., Yaldizli O., Esser S., Thiermann J., Koutsilieri E., Arendt G., Diener H.C., Maschke M.: German Competence Network HIV/AIDS. Substantia nigra hyperechogenicity and CSF dopamine depletion in HIV. *J. Neurol.* **256**, 948–953(2009)
69. Oikonen M., Laaksonen M., Aalto V., Ilonen J., Salonen R., Erälinna J.P., Panelius M., Salmi A.: Temporal relationship between environmental influenza A and Epstein-Barr viral infections and high multiple sclerosis relapse occurrence. *Mult. Scler.* **17**, 672–680 (2011)
70. Paradowska-Stankiewicz I., Chrześcijańska I.: Lyme borreliosis in Poland in 2009. *Przegl. Epidemiol.* **65**, 279–280 (2011)
71. Parratt J., Tavendale R., O'Riordan J., Parratt D., Swingler R.: Chlamydia pneumoniae-specific serum immune complexes in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **14**, 292–299 (2008)
72. Pirko I., Cardin R., Chen Y., Lohrey A.K., Lindquist D.M., Dunn R.S., Zivadinov R., Johnson A.J.: CMV infection attenuates the disease course in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One,* **7**, e32767 (2012)
73. Potemkowski A.: An epidemiologic survey of multiple sclerosis in the Szczecin province in Poland. *Przegl. Epidemiol.* **55**, 331–341 (2001)
74. Prashantha D.K., Netravathi M., Ravishankar S., Panda S., Pal P.K.: Reversible parkinsonism following ventriculoperitoneal shunt in a patient with obstructive hydrocephalus secondary to intraventricular neurocysticercosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **110**, 718–721 (2008)
75. Puchhammer-Stöckl E., Aberle S.W., Heinzl H.: Association of age and gender with alphaherpesvirus infections of the central nervous system in the immunocompetent host. *J. Clin. Virol.* **53**, 356–359 (2012)
76. Ramos J.M., Toro C., Reyes F., Amor A., Gutiérrez F.: Seroprevalence of HIV-1, HBV, HTLV-1 and Treponema pallidum among pregnant women in a rural hospital in Southern Ethiopia. *J. Clin. Virol.* **51**, 83–85 (2011)
77. Reitz C., Brayne C., Mayeux R.: Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 137–152 (2011)
78. Rizzoli A., Hauffe H., Carpi G., Vourc H.G., Neteler M., Rosa R.: Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* **16**, 1–8 (2011)
79. Rook G.A.: Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 5–15 (2012)
80. Rosińska M., Zieliński A.: Recent increase in HIV rate by age, cohort, period analysis of surveillance data suggests changes in HIV epidemiology in Poland. *Cent. Eur. J. Public Health,* **19**, 123–127 (2011)
81. Roubaud-Baudron C., Krolak-Salmon P., Quadrio I., Mégraud F., Salles N.: Impact of chronic Helicobacter pylori infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol. Aging.* **33**, e11–9 (2012)
82. Rubicz R., Leach C.T., Kraig E., Dhurandhar N.V., Grubbs B., Blangero J., Yolken R., Göring H.H.: Seroprevalence of 13 common pathogens in a rapidly growing U.S. minority population: Mexican Americans from San Antonio, TX. *BMC Res. Notes,* **4**, 433 (2011)
83. Sá D.S., Teive H.A., Troiano A.R., Werneck L.C.: Parkinsonism associated with neurocysticercosis. *Parkinsonism Relat. Disord.* **11**, 69–72 (2005)
84. Sadovnick A.D.: Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **11**, 163–166 (2012)

85. Santón A., Cristóbal E., Aparicio M., Royuela A., Villar L.M., Alvarez-Cermeño J.C.: High frequency of co-infection by Epstein-Barr virus types 1 and 2 in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **17**, 1295–1300 (2011)
86. Sauerbrei A., Schmitt S., Scheper T., Brandstädt A., Saschenbrecker S., Motz M., Soutschek E., Wutzler P.: Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro Surveill.* **16**, 20005 (2011)
87. Sellner J., Kraus J., Awad A., Milo R., Hemmer B., Stüve O.: The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis a critical analysis of potential environmental factors. *Autoimmun. Rev.* **10**, 495–502 (2011)
88. Shima K., Kuhlenbäumer G., Rupp J.: Chlamydia pneumoniae infection and Alzheimer's disease: a connection to remember? *Med. Microbiol. Immunol.* **199**, 283–289 (2010)
89. Shiota S., Murakami K., Yoshiiwa A., Yamamoto K., Ohno S., Kuroda A., Mizukami K., Hanada K., Okimoto T., Kodama M., Abe K., Yamaoka Y., Fujioka T.: The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J. Neurol.* **258**, 1460–1463 (2011)
90. Špeljko T., Jutric D., Šimić G.: HSV1 in Alzheimer's disease: Myth or reality? *Translational Neuroscience*, **2**, 61–68 (2012)
91. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet,* **379**, 461–473 (2012)
92. Tang Y.W., Sriram S., Li H., Yao S.Y., Meng S., Mitchell W.M., Stratton C.W.: Qualitative and quantitative detection of Chlamydophila pneumoniae DNA in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients and controls. *PLoS One*, **4**, e5200 (2009)
93. Taylor B.V.: The major cause of multiple sclerosis is environmental: genetics has a minor role yes. *Mult. Scler.* **17**, 1171–1173 (2011)
94. Toepfner N., Cepok S., Grummel V., Hemmer B.: The role of the Epstein-Barr virus receptor CD21 in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **242**, 47–51 (2012)
95. Uzun S., Kozumplik O., Folnegović-Smalc V.: Alzheimer's dementia: current data review. *Coll. Antropol.* **35**, 1333–1337 (2011)
96. Voorend M., van der Ven A.J., Mulder M., Lodder J., Steinbusch H.W., Bruggeman C.A.: Chlamydia pneumoniae infection enhances microglial activation in atherosclerotic mice. *Neurobiol. Aging,* **31**, 1766–1773 (2010)
97. Voumvourakis K.I., Kitsos D.K., Tsiodras S., Petrikkos G., Stamboulis E.: Human herpesvirus 6 infection as a trigger of multiple sclerosis. *Mayo Clin. Proc.* **85**, 1023–1030 (2010)
98. Wozniak M.A., Frost A.L., Itzhaki R.F.: Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1. *J. Alzheimers Dis*. **16**, 341–350 (2009)
99. Wyss-Coray T., Rogers J.: Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbour. Perspect.* Med. **2**, a006346 (2012)
100. Zhang J., Liu J., Katafiasz B., Fox H., Xiong H.: HIV-1 gp120-induced axonal injury detected by accumulation of β-amyloid precursor protein in adult rat corpus callosum. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **6**, 650–657 (2011)

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 105–109
http://www.pm.microbiology.pl

MIMIWIRUS APMV, MAMAWIRUS ORAZ JEGO WIROFAG – BUDOWA I CHARAKTERYSTYKA

Beata Tokarz-Deptuła[1]*, Joanna Śliwa-Dominiak[1], Michał Kubiś[1], Wiesław Deptuła[1]

[1] Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Biologii US, ul. Felczaka 3c 71-412 Szczecin

Wpłynęło w marcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka wirusa APMV. 3. Mimiwirus APMV, a super-rodzina NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses). 4. Wirofag mamawirusa. 5. Podsumowanie

APMV Mimivirus, mamavirus and its virophage – structure and characteristics

Abstract: This paper describes APMV Mimivirus, which belongs to the NCLDV super-family. The representatives of this super-family shed light a lot of biological secrets. The role of this virus is not known and this fact forms the basis for the discussion about common origin of viruses and eukaryote. In this paper a new, not yet registered virophage is presented.

1. Introduction. 2. Characteristic of APMV virus. 3. Mimivirus and super-family of NCLDV (Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses). 4. Mamavirus virophage. 5. Summary

Słowa kluczowe: mamawirus, mimiwirus, środowisko wodne, wirofag, wirus olbrzymi
Key words: mamavirus, mimivirus, giant virus, virophage, water environment

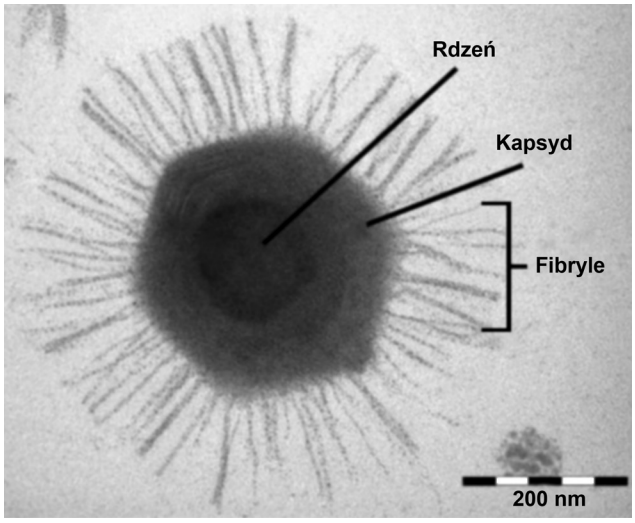
1. Wprowadzenie

Wirus APMV (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*) – to olbrzymi wirus DNA infekujący pierwotniaki z rodzaju *Acanthamoeba*, który został zidentyfikowany w 2003 roku [1,3,9], a według obowiązującej systematyki zaklasyfikowany jako jedyny gatunek należący do rodziny *Mimiviridae*, rodzaj *Mimivirus* [5]. Kompletny genom mimiwirusa APMV opublikowali G h e d i n i C l a v e r i e w 2005 r. [3]. Jak wykazano, wirus ten jest najbardziej złożonym wirusem spośród wszystkich opisanych do tej pory [1–3, 7, 9]. Poza niezwykłymi rozmiarami, charakteryzuje się on posiadaniem, po raz pierwszy stwierdzonych u wirusów, homologów wielu genów organizmów wielokomórkowych [3]. Fakty te stały się powodem nowych rozważań dotyczących pochodzenia wirusów i roli jaką odegrały one przy powstawaniu komórek eukariotycznych [1, 3, 9]. Wykazano bowiem, że posiada on m.in. geny kodujące centralne elementy systemu translacji białek, które wcześniej znane były jedynie u organizmów eukariotycznych oraz unikalne cechy cyklu replikacji [1, 3]. Ponadto ciekawym jest też jego występowanie w środowisku wodnym, głównie w oceanach [1, 3]. Badania [3] sugerują, że w bliskim kontakcie z przodkiem mimiwirusa mogły być koralowce z rodzaju *Octocorallia,* mające w jamie chłonno-trawiącej 8 przegród i żyjące także głównie w wodach morskich i oceanicznych [6]. Prawdopodobnie także gąbki mogą być gospodarzem niezidentyfikowanych jeszcze, ale znacznie większych niż wirus APMV, członków rodziny *Mimiviridae* [3].

2. Charakterystyka wirusa APMV

Wirus APMV został zaobserwowany w 1992 roku w Wielkiej Brytanii w wodach przemysłowej wieży chłodniczej w Bradford [3, 7, 9]. Timothy R o w b o t h a m, który wykrył ten mikroorganizm, o tak ogromnych rozmiarach, pomylił go z bakterią i stąd wzięła się nazwa mimiwirus (*Mimicking Microbe Virus* – wirus udające mikroba) [3, 9]. Ten nowo zarejestrowany „mikrob", podobny do bakterii Gram-dodatnich, był w stanie namnażać się w warunkach laboratoryjnych, stąd początkowo jego odkrywca R o w b o t h a m, nazwał go *Bradfordcoccus*, nie dostrzegając jego charakteru wirusowego [3]. Dopiero 10 lat później, francuscy badacze z Krajowego Centrum Badań Naukowych przy Uniwersytecie Śródziemnomorskim w Marsylii, zajmujący się riketsjami i nowymi patogenami, zidentyfikowali i opisali tego gigantycznego wirusa, infekującego ameby z rodzaju *Acanthamoeba* nadając mu, jak wspomniano wcześniej nazwę mimiwirus [1, 3, 9]. Atakowane przez ten wirus ameby osiągają rozmiary od 15 do 35 μm [8] i występują powszechnie w wodach (w tym słodkich), ale także w glebie, powietrzu oraz w innych środowiskach [3]. Mimiwirus (Rys. 1) to bezotoczkowy wirus, o symetrii kubicznej i średnicy ok. 0,7 μm [2, 3, 7, 14]. Rozmiary jakie osiąga, jak na wirusy, są ogromne, ponieważ wielkości znanych wirusów oscylują w granicach od 0,03 μm (parwowirusy) do 0,27 μm (pokswirusy) [13] i dlatego nie trudno było go pierwotnie pomylić z bakterią, jako że te ostatnie mają od 0,03 μm (nanobakterie) do nawet 300 μm (*Thiomargarita namibiensis*) [13], choć

* Autor korespondencyjny: Beata Tokarz-Deptuła, Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 1605; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl



Rys. 1. Schemat budowy mimiwirusa [12]

ich przeciętne rozmiary mieszczą się od 0,1 do 30 μm [13]. Genom mimiwirusa to dwuniciowe liniowe DNA (dsDNA) wielkości 1,185 Mpz, który koduje prawie 900 białek [2, 3, 7, 9].

Wyjątkowe są też elementy genomu pełniące określone funkcje, a niespotykane wcześniej u wirusów (Tabela I). Ważne cechy genomu APMV to m.in. obecność wielu elementów naprawy DNA, a także enzymy syntezy polisacharydów [1, 3, 7, 9, 10]. Wśród enzymów mimiwirusa odnotowano obecność m.in. kinazy deoksynukleozydów (DNK), deaminazy cytydyny, jak również pierwsze kinazy difosforanów nukleozydów (NdK) [10].

APMV jest jedynym wirusem, który posiada jednocześnie topoizomerazy typu IA, IB, a także typu II [10]. Jak wspomniano wcześniej, genom mimiwirusa posiada geny kodujące centralne elementy systemu translacji białek, które zauważalne były jedynie u organizmów eukariotycznych, a wśród których wymienić można np.: syntetazę czterech aminoacylo-tRNA, czynnik inicjacji translacji 4E, czynnik translacyjny EF-TU, czynnik inicjacji translacji SUI1 oraz IF-4A, a także czynnik uwalniania łańcucha peptydowego eRF1 [10]. W genomie mimiwirusa zidentyfikowano pierwszy wirusowy homolog enzymu modyfikującego tRNA (uracylo-5-metylotransferaza tRNA) [1, 3, 7, 9, 10]. Analiza genomu APMV ujawniła także kilka rodzajów homologów enzymów zaangażowanych w naprawę DNA np. ORF R406 (Open Reading Frame – otwarta ramka odczytu), która jest homologiczna do wielu genów bakteryjnych biorących udział w naprawie DNA [10]. Niespotykane wcześniej u wirusów, a występujące u APMV, jest białko z rodziny cyklofilin (ORF L605) zaangażowane w zwijanie białek [10]. Nadto genom APMV koduje homologi wielu enzymów związanych z metabolizmem np.: syntazę asparaginy (ORF R475) i GMP (ORF L716) oraz syntetazę glutaminy (ORF R565) [10]. Wszystkie te czynniki odnotowano po raz pierwszy w wirusowym DNA [10] i co ciekawe, niektóre białka tego wirusa są glikozylowane, głównie te, które budują jego kapsyd [10]. Jest też ciekawym, że cząsteczki APMV można barwić standardową metodą Grama, co sugeruje obecność siatki polisacharydów na jego powierzchni [10]. Wszystkie te informacje [1, 3, 7, 9, 10] stały się platformą dyskusji na temat pochodzenia tych dużych wirusów DNA i ich ewentualnej roli w powstawaniu organizmów eukariotycznych, a także w „przejściu" komórkowego genomu od RNA do DNA. Trzeba dodać także i to, że złożoność genomu tego olbrzymiego wirusa DNA, narzuca istnienie odpowiedniego planu w konstrukcji jego cząstek, co jest ważne przy wnikaniu do organizmu gospodarza i czasu jego infekcji. Wykazano, że jego występowanie w komórce gospodarza, przypomina rozwój komórki w komórce, bo następuje import energii i metabolitów z cytoplazmy gospodarza do struktur

Tabela I
Wybrane, nietypowe cechy gonomu APMV [10]

ORF	Kodowane białka	Funkcja
R663	Syntetaza arginylo-tRNA	Translacja
L124	Syntetaza tyrozyno-tRNA	Translacja
L164	Syntetaza cysteino-tRNA	Translacja
R639	Syntetaza metionylo-tRNA	Translacja
R405	Metylotransferaza tRNA	Modyfikacja tRNA
L687	Endonukleaza naprawiająca uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem UV	Naprawa DNA
L254 L393	Białka szoku termicznego	Rola przy budowaniu kapsydu APMV
R565	Syntetaza glutaminy	Metabolizm
R689	N-acetyloglukozamino-1-fosforan	Synteza polisacharydów
L612	Izomeraza mannozo-6P	Glikozylacja
L906	Cholinesteraza	Prawdopodobnie infekcja gospodarza
R807	Reduktaza 7-dehydrocholesterol	Prawdopodobnie infekcja gospodarza

wirusa [3]. Według Claverie i wsp. [3] pojawienie się w przyrodzie tych dużych wirusów DNA, może być wynikiem ewolucyjnych zmian w kierunku pasożytnictwa wewnątrzkomórkowego, w efekcie których kluczowym wydarzeniem jest utracenie zdolności translacji białek, ale nie szlaków metabolicznych. Stad według tych autorów [3] badania dotyczące wyjaśnienia molekularnych szczegółów cyklu replikacji APMV w organizmie *Acanthamoeba,* są tak ważne, bo wiążą się z faktem ewentualnego uzyskania informacji odnośnie ewolucyjnego pochodzenia „wirusów olbrzymów" [3]. Jak wykazano, w wielu próbkach pochodzących ze środowiska wodnego, występuje wiele wirusów DNA zbliżonych do mimiwirusa [1, 3]. Stąd zakłada się [1, 3], że istnieje jeszcze wiele niezidentyfikowanych gatunków z rodziny *Mimiviridae* i są to prawdopodobnie czynniki infekujące nie tylko koralowce (*Octocorallia*), ale także pierwotniaki oraz morskie bezkręgowce. Autorzy ci [1, 3] sugerują, że są one powszechne w środowisku wodnym i mają znaczący wpływ na regulowanie planktonowych populacji oraz innych morskich bezkręgowców. Dowodem tego są badania [3], w których wykazano, że wyizolowany genom mimiwirusów z Morza Sargassowego, wykazał aż 43% genów rdzeniowych, homologicznych dla opisanego mimiwirusa APMV. Obecnie przyjmuje się, że istnieje wiele dowodów na ich istnienie i mimo braku izolacji i charakterystyki większości z tych metagenomów, nie przeszkadza, by twierdzić, że stanowią one znaczącą część wirusów infekujących wiele gatunków ze świata zwierząt żyjących w morzach i oceanach, a także prawdopodobnie w wodach słodkich [1, 3]. Dowodem pośrednim istnienia mimiwirusów w środowiskach wodnych, mimo braku ilościowej oceny ich częstości występowania, jest fakt powiązania ich np. z morskimi bezkręgowcami, jakimi są koralowce, ale także gąbki [3]. W badaniach tych wykryto, że w mitochondrialnym DNA koralowca *Sarcophyton glaucum,* są homologiczne geny do tych, które kodują bakteryjne białko MutS [3], będące komórkowym „strażnikiem wierności" replikacji, a które spośród milionów par zasad DNA, posiada zdolność rozpoznania pojedynczej niekomplementarności [11]. Efektem tego jest to, że białko MutS precyzyjnie nakierowuje maszynerię biologiczną usuwającą błędy poreplikacyjne do ściśle określonej lokalizacji w DNA [11]. Te ostatnie fakty to swoiste cechy wirusa APMV, zwanego także wirusem olbrzymim, bo jedną z nich jest rozbieżność w kodowaniu genów homologów białek MutS [1–3, 7, 9]. Badania porównawcze białek MutS wykazały zależność między genami kodującymi homologię tych białek u mimiwirusa APMV, a genami mitochondrialnymi koralowców *Octocorales* [3], co tłumaczy, że dzięki mimiwirusom, u ameb stworzona została platforma umożliwiająca wymianę genów na zasadzie transferu między prokariontami i eukariontami [3].

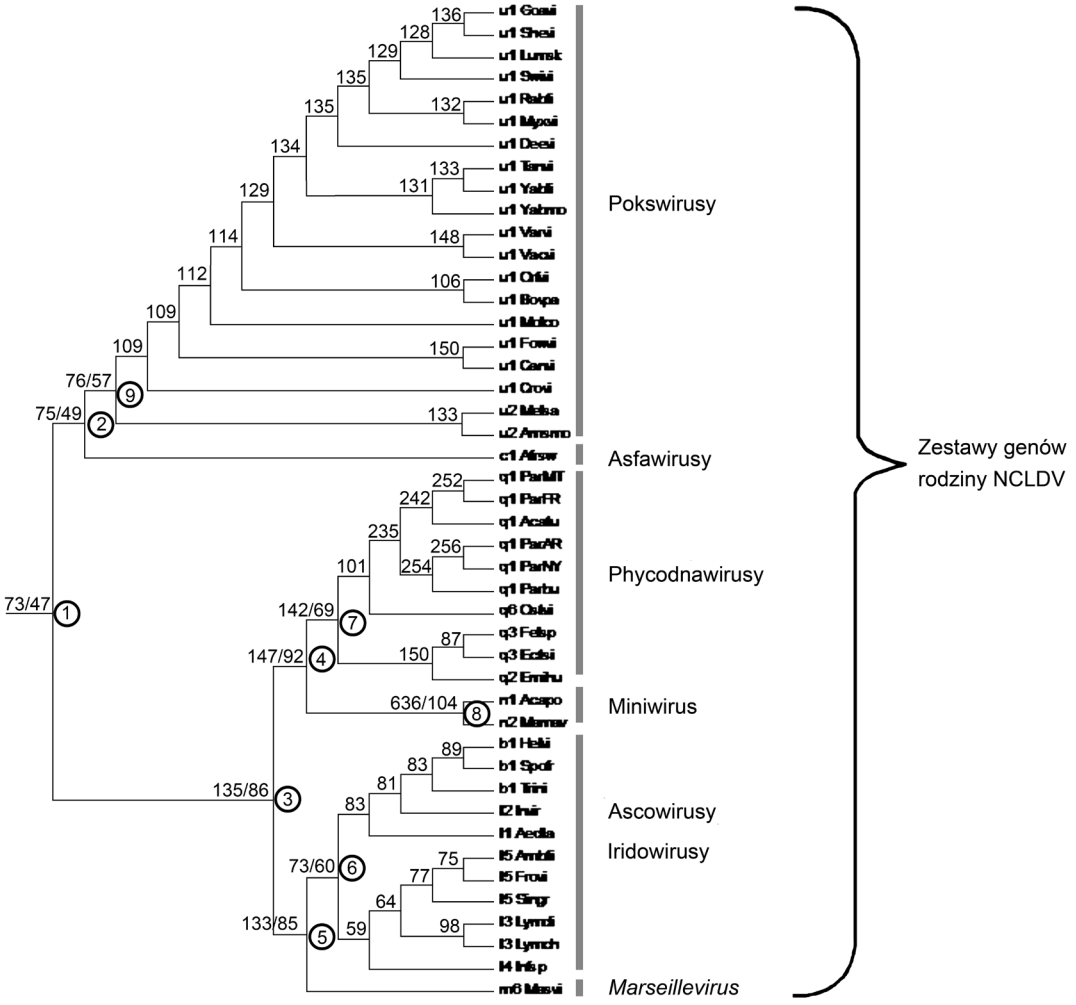
3. Mimiwirus APMV, a super-rodzina NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses)

Punktem zwrotnym w pracy nad genomiką porównawczą mimiwirusa AMPV, były badania Iyer'a i wsp. [cyt. wg 3], którzy zaproponowali pogrupować wirusy z dużym dwuniciowym DNA w super-rodziny NCLDV [cyt. za 2, 3], do których zaliczono: phycodnawirusy – infekujące glony, iridowirusy – infekujące głównie ryby, ASF wirusy – wirus afrykańskiego pomoru świń i pokswirusy – zakażające ssaki [2, 3]. Wśród cech super-rodziny NCLDV, należy wymienić geny rdzeniowe, a także ich cykl replikacji odbywający się głównie w cytoplazmie żywiciela [3]. Wirusy należące do tej rodziny posiadają kapsyd o symetrii kubicznej (z wyjątkiem pokswirusów) i dość kompletny kodowany przez wirus aparat transkrypcji [3]. Podano także, że charakterystyczną cechą dla zakażeń wirusami z super-rodziny NCLDV, są widocznie inkluzje wewnątrz cytoplazmy, zwane „fabryką cząstek wirusa". Natomiast badając sekwencje genomowe mimiwirusa APMV wykazano, że mimo iż należy on do super-rodziny NCLDV [2, 3], brak u niego wczesnej interakcji z materiałem genetycznym infekowanej komórki gospodarza [3]. Oznacza to, że u mimiwirusa APMV, funkcjonowanie kompleksu inicjującego transkrypcję wczesnych genów w cytoplazmie gospodarza, musi rozpocząć się natychmiast po infekcji [3]. Niezależnie od tych faktów wykazano, że mimiwirus APMV zajmuje istotne miejsce wśród wirusów super-rodziny NCLDV, ale bliskość filogenetyczną wykazuje tylko z phycodnawirusami i iridowirusami (Rys. 2), jak też podobny jest do nich w zakresie symetrii budowy [3, 15].

Dowiedziono, że APMV jest obdarzony pełnym aparatem replikacyjnym umożliwiającym rozpoczęcie początkowej fazy replikacji, niezależnie od jądra komórki gospodarza, co zbliża go pod tym względem do pokswirusów [3]. Przyjmuje się, że zgodnie z teorią zakładającą ewolucję redukcyjną, genom mimiwirusów posiada dużo cech wspólnych z hipotetycznymi wspólnymi przodkami super-rodziny NCLDV [2, 3].

4. Wirofag mamawirusa

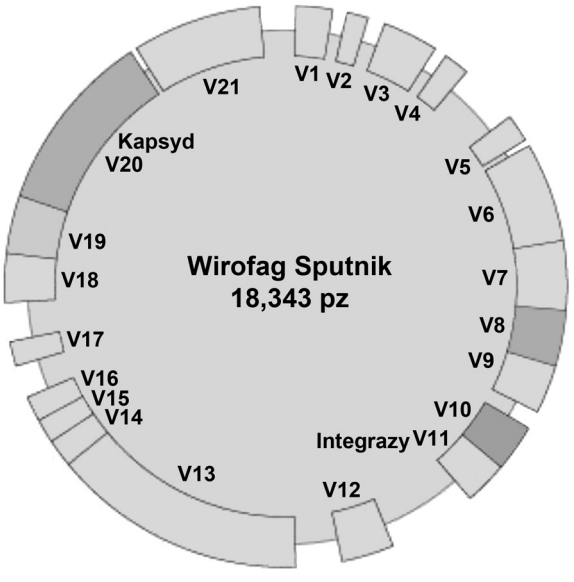
Wirus to zakaźny nukleoproteid posiadający tylko jeden rodzaj kwasu nukleinowego oraz receptor, który służy do przyłączania się do komórek gospodarza [4]. Stąd replikacja i „byt" wirusów są całkowicie zależne od żywych komórek eukariotycznych, bądź prokariotycznych, bo nie wykazują one metabolizmu [4]. Natomiast badania nad „olbrzymimi" wirusami wykazały, że mogą być one infekowane przez inne wirusy [1, 7, 9]. Fakt ten rzuca nowe światło na „życie" wirusów, a także sugeruje, że została przekroczona bariera dzieląca wirusy



Rys. 2. Rekonstrukcja rodowych zestawów genów rodziny NCLDV [15]

od organizmów komórkowych [1, 9]. Związane jest to z faktem opisania [cyt. wg 3] nowego przedstawiciela wirusów olbrzymów – mamawirusa, nazwanego tak, ponieważ był większy od opisanego mimiwirusa APMV [1, 3, 7, 9]. Obserwacje te [1, 3, 7, 9], prowadzone przy pomocy mikroskopu elektronowego, wykazały obecność na kapsydzie mamawirusa, drugiego małego wirusa, ściśle z nim związanego. Nadano mu nazwę Sputnik (ros. „towarzysz podróży") na cześć pierwszego satelity Ziemi [1, 7, 9]. Ten mały wirus ma wielkość ok. 50 nm, namnaża się gwałtownie po fazie eklipsy (utajenia) [7, 9], a jego genom w postaci dwuniciowego kolistego DNA posiada 18,393 pz [7, 14] (Rys. 3). Trzeba dodać, że kiedy mimiwirus APMV lub członkowie rodziny *Mimiviridae*, infekują żywą komórkę, tworzą w niej poprzez ekspresję genów „fabrykę cząsteczek wirusowych", która bardzo przypomina jądro komórkowe [7, 9]. Taki sam schemat infekcyjny opisano u mamawirusa i to właśnie ta jego „fabryka cząsteczek wirusowych", jest celem infekcji Sputnika [1, 7, 9]. Wykazano, że rozwój Sputnika jest szkodliwy dla mamawirusa, gdyż wywołuje produkcję niekompletnych form i anormalnych części kapsydu pierwotnego wirusa [7, 9].

Dowiedziono, że spośród 21 genów kodujących białka u Sputnika, co najmniej 3 wykazują wyraźną homologię do genów białek występujących u mimiwirusa APMV [7, 9]. Przyjęto, że najbardziej prawdopodobnym mode-



Rys. 3. Graficzne przedstawienie zestawu genomowego Sputnika [14]

lem tłumaczącym ten fakt jest to, że Sputnik nabył część genu (lub cały gen, który później został zredukowany) od mamawirusa, po jego oddzieleniu od wspólnego przodka jakim jest mimiwirus [7]. Biorąc pod uwagę analogię Sputnika do bakteriofagów, został on zaklasyfikowany jako wirofag (virophage), który może stanowić mechanizm pośredniczący w bocznym transferze genów między gigantycznymi wirusami [7, 9]. Zaobserwowano także, że koinfekcja Sputnika, była związana ze znaczącym wzrostem tworzenia się anormalnych wirionów mamawirusa, charakteryzujących się miejscowym zagęszczeniem kapsydu [7]. Stwierdzono także, że w niezainfekowanym wirionie mamawirusa, warstwa kapsydu miała grubość 40 nm, natomiast podczas obecności Sputnika wynosiła 240 nm [7]. Wykazano też, że zainfekowanie mamawirusa Sputnikiem, powoduje wzrost wydajności infekcyjnych mamawirusa ok. 70% oraz rejestruje się trzykrotne przyspieszenie lizy komórek ameby w ciągu 24 godzin po infekcji [7]. Te fakty obrazują, że Sputnik jest „pasożytem" mamawirusa, który wpływa znacznie na reprodukcję żywiciela [7, 9].

5. Podsumowanie

Przedstawione fakty [1–3, 7, 9, 10] upoważniają do przypuszczeń, że mimiwirusy, głównie w środowisku wodnym, wyewoluują do tego stopnia, że być może zainfekują także inne morskie zwierzęta, tak jak robią to obecnie wśród np. koralowców [1, 3]. Na razie jednak wiedza na temat tych „olbrzymów" wśród wirusów jest zbyt skąpa, chociaż rozważanie o nich pobudza ciekawość badaczy, bo niezwykłość wirusa APMV, ale także opisanego mamawirusa i jego wirofaga, dotyczy niespotykanych dotąd faktów wśród „obiektów" biologicznych [1–3, 7, 9, 10]. Nadto dane z tego zakresu doprowadziły do wznowienia dyskusji na temat wspólnego pochodzenia wirusów i organizmów komórkowych [1, 7, 9], a także wskazują, że czynniki zakaźne tak powszechnie występujące w środowisku wodnym, o tak ogromnych rozmiarach jak mimiwirus APMV (także mamawirus), mimo wielu nowych metod stosowanych w naukach biologicznych, zostały odkryte i zidentyfikowane stosunkowo niedawno [1, 3, 7, 9], co dowodziłoby, że przyroda zawiera jeszcze wiele tajemniczych faktów dla człowieka, również w zakresie wirusologii.

Piśmiennictwo

1. Claverie J.M., Ogata H.: How to Infect a Mimivirus. *Science*, **321**, 1305–1306 (2008)
2. Claverie J.M., Abergel C.: Mimivirus and its Virophage. *Annu. Rev. Genet*. **43**, 49–66 (2009)
3. Claverie J.M., Grzela R., Lartigue A., Bernadac A., Nitsche S., Vacelet J., Ogata H., Abergel C.: Mimivirus and Mimiviridae: Giant viruses with an increasing number of potential hosts, including corals and sponges. *J. Invertebr. Pathol*. **101**, 172–180 (2009)
4. Collier L., Oxford J.: *Wirusologia. Podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2001
5. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV Master Species List 2009, http://www.ictvonline.org
6. Jura C.: *Bezkręgowce. Podstawy morfologii funkcjonalnej, systematyki i filogenezy*; Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2004
7. La Scola B., Desnues C., Pagnier I., Robert C., Barrassi L., Fournous G., Merchat M., Suzan-Monti M., Forterre P., Koonin E., Raoult D.: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus, *Nature*, **455**, 100–105 (2008)
8. F. Marciano-Cabral, G. Cabral: Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans; *CMR*, 273–307 (2003) http://cmr.asm.org/cgi/content/full/16/2/273
9. Pearson H.: 'Virophage' suggests viruses are alive, *Nature*, **454**, 677 (2007)
10. Raoult D. i wsp.: The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus. *Science*, **306**, 1344–1350 (2004)
11. Sachadyn P.: http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Mikrobiologia/metagenomy.info.htm
12. Science Photo Library http://www.sciencephoto.com/media/78841/enlarge
13. Śliwa J., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W.: Tajemniczy świat nanobakterii. *Laboratorium Medyczne*, **12**, 40–41 (2008)
14. Viralzone http://expasy.org/viralzone/all_by_species/670.html
15. Virology Journal http://www.virologyj.com/content/6/1/223/figure/F8

POST. MIKROBIOL.,
2013, 52, 1, 111–118
http://www.pm.microbiology.pl

KOPROSKOPOWE METODY ILOŚCIOWE W WETERYNARYJNEJ DIAGNOSTYCE PARAZYTOLOGICZNEJ – ZASTOSOWANIE I PROBLEMY W SZACOWANIU ICH SKUTECZNOŚCI

Maciej Kochanowski[1*], Jacek Karamon[1], Joanna Dąbrowska[1], Tomasz Cencek[1]

[1] Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Puławy

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Przykładowe ilościowe metody parazytologiczne. 3. Przygotowanie preparatu do bad0ania. 4. Izolacja form rozwojowych pasożytów. 5. Sposób obliczania form pasożytniczych pod mikroskopem świetlnym. 6. Właściwości badanego materiału. 7. Sposoby oceny parametrów charakteryzujących metody parazytologiczne. 8. Podsumowanie

Coproscopical quantitative methods in the parasitological diagnosis – the use and problems with estimation of their efficiency

Abstract: The article is review about various aspects of coproscopical diagnostic methods. It describes selected methods and factors having significant influence on their efficiency, including preparation of the specimen, methods of isolation of developmental parasitic forms and calculating them under a microscope, the influence of feaces and parasitic forms properties and methods of calculating the multiplication factor to estimation the number of parasitic forms in 1 g of sample. In particular, it discusses problems associated with estimation the efficiency of these methods and calculation of the real content of the parasitic forms in the sample.

1. Introduction. 2. Examples of quantitative parasitological methods. 3. Preparation of specimen to investigation. 4. Isolation of developmental parasitic forms. 5. Methods for calculation of parasitic forms using the light microscop. 6. Properties of the investigated material. 7. The ways of estimation of the parameters characterizing the parasitological methods. 8. Summary

Słowo kluczowe: diagnostyka parazytologiczna, metody ilościowe, metody koproskopowe, skuteczność
Key words: coproscopical methods, efficiency, quantitative methods, parasitological diagnostic

Wprowadzenie

Środowiskiem bytowania większości pasożytów wewnętrznych jest przewód pokarmowy. Diagnostyka tych inwazji jest najczęściej przeprowadzana za pomocą metod koproskopowych. Są to metody szybkie i nie wymagające do wykonania zaawansowanego sprzętu. Jednak ocena preparatów jest trudna – opiera się na identyfikacji cech morfologicznych form rozwojowych pasożytów. Ponadto badanie musi być wykonane w stosunkowo krótkim czasie ze względu na nietrwałość preparatu diagnostycznego spowodowanego np. uszkodzeniem osmotycznym form rozwojowych pasożytów, opadaniem form pasożytniczych w słupie cieczy, wysychaniem preparatu. Dlatego też doświadczenie diagnosty laboratoryjnego wykonującego badanie ma podstawowe znaczenie dla precyzji badania.

Wśród technik koproskopowych wyróżniamy metody jakościowe – służące jedynie do stwierdzenia inwazji pasożytniczej i metody ilościowe – umożliwiające oszacowanie liczby form rozwojowych pasożytów w jednostce masy kału i pozwalające na przybliżone określenie intensywności inwazji. Oszacowanie ilości form pasożytniczych w jednostce masy kału jest istotne, ponieważ np. wykrycie pojedynczych form rozwojowych pasożytów w kale nie musi świadczyć o inwazji. Pojedyncze formy pasożytnicze wykrywane w kale mogą być jedynie wynikiem biernego pasażu przez przewód pokarmowy, a nie inwazji pasożytniczej. Według B o e s oraz R o e p s t o r f f [1, 20] taki przypadek należy brać pod uwagę np. przy stwierdzeniu za pomocą metody McMastera 200 lub mniej jaj *Ascaris suum* w 1 g kału świńskiego. Ponadto obecność w kale nieznacznej ilości form pasożytniczych świadczących o niskiej intensywności inwazji pasożytniczej może nie wymagać postępowania leczniczego. Na przykład u owiec, u których w kale obecne są oocysty kokcydiów w liczbie nie przekraczającej 20 tysięcy w 1 g kału na ogół nie stwierdza się objawów klinicznych i stan taki nie wymaga interwencji lekarskiej. Przy intensywnej inwazji pasożytniczej

* Autor korespondencyjny: Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: maciej.kochanowski@piwet.pulawy.pl

konieczne jest natomiast bardzo ostrożne postępowanie terapeutyczne ze względu na ryzyko zatrucia organizmu żywiciela produktami rozpadu form pasożytniczych lub zaczopowania światła przewodu pokarmowego obumarłymi pasożytami. Oszacowanie liczby jaj pasożytów ma również zastosowanie przy wykrywaniu oporności pasożytów na leki przeciwpasożytnicze.

2. Przykładowe ilościowe metody parazytologiczne

Wśród ilościowych metod koproskopowych można wyróżnić metody nie zagęszczające oraz metody umożliwiające koncentrację form pasożytniczych – techniki flotacyjne i sedymentacyjne oraz metody będące połączeniem tych technik. Metodą, w której nie stosuje się technik zagęszczających form rozwojowych pasożytów są metoda Stoll'a gdzie wykonywana jest jedynie homogenizacja próbki w odpowiedniej objętości roztworu ługu sodowego oraz metoda Caldwell'a – homogenizacja próbki odbywa się w roztworze podchlorynu sodu, a 70% roztwór sacharozy ułatwia utrzymanie jaj w zawiesinie. Techniki flotacyjne: metoda McMastera, Wisconsin, FECPAK, FLOTAC i inne różnią się rodzajem wykorzystywanych komór obliczeniowych, występowaniem etapu wirowania, różnego rodzaju metodami homogenizacji badanego materiału oraz rodzajem zastosowanych płynów flotacyjnych. Jedną z nielicznych ilościowych metod sedymentacyjnych w diagnostyce parazytologicznej jest metoda SCT (sedimentation and counting technique) umożliwiająca wykrycie w treści jelit tasiemców z rodzaju *Echinococcus*.

Metoda Stoll'a [21, 22]. W metodzie tej do 3 g próbki kału dodaje się 10-M roztwór NaOH (dopełniając do objętości 45 ml). Następnie wprowadza się perełki szklane i wstrząsa naczynie w celu homogenizacji próbki. Zawiesinę pozostawia się na 24 h, po czym pobiera się 0,15 ml roztworu, nakrapla na szkiełko podstawowe i przykrywa szkiełkiem nakrywkowym. Preparat należy oglądać pod mikroskopem świetlnym, a liczba wykrytych form rozwojowych pasożytów pomnożona przez 100 daje liczbę jaj pasożytów zawartą w 1 g kału. W metodzie tej uwzględnione zostały współczynniki korekcyjne w zależności od konsystencji kału. Wnoszą one odpowiednio: x2 dla kału pastowatego, x3 dla kału półpłynnego, x4 dla kału płynnego.

Metoda Caldwell'a [21]. Podobnie jak w metodzie Stoll'a homogenizacja kału odbywa się przez zastosowanie związku chemicznego. W metodzie Caldwell'a zamiast ługu sodowego używa się roztworu podchlorynu sodu. Zważoną 4-gramową próbkę kału zalewa się 4 ml 30% roztworu NaOCl i miesza się zawartość. Po godzinie dodaj się 75% roztwór sacharozy (dopełniając zawiesinę do objętości 40 ml). Zawiesinę wstrząsa się w celu zmieszania i pobiera do badania mikroskopowego 0,1 ml zawiesiny. Liczba wykrytych podczas badania form pasożytniczych pomnożona przez współczynnik 100 odpowiada liczbie pasożytów w 1 g kału.

Określanie liczby oocyst Cryptosporidium z zastosowaniem komory Fuchs-Rosenthal'a [25]. W metodzie próbka kału z wodą jest mieszana w stosunku 1:2. Następnie próbka jest rozdrabniana za pomocą miksera. Po rozdrobnieniu 15 ml próbki jest przenoszone do zlewki, a do zawiesiny należy dodać 100 ml 4% wodnego roztworu formaliny. Zawiesina jest mieszana na mieszadełku magnetycznym i następnie pozostawiana w celu sedymentacji większych cząstek zawiesiny. Następnie jest pobierane za pomocą pipety 60 µl zawiesiny z głębokości 1 cm. Pobrana zawiesina jest wprowadzana do komory Fuchs-Rosenthal'a, która jest pozostawiana na 4 minuty, aby umożliwić sedymentację oocyst. Oocysty są liczone pod powiększeniem x400 na powierzchni 1 mm^2 komory. W celu obliczenia liczby oocyst w 1 g kału należy liczbę wykrytych oocyst pomnożyć przez 10^5.

Metoda Wisconsin wg Cox and Tod [4]. Pięć gramów próbki kału należy zmieszać z wodę (dopełniając do objętości 30 ml), a uzyskaną zawiesinę zamieszać i przesączyć przez gazę. Dwanaście mililitrów przesączonej zawiesiny należy przelać do 12 ml probówki i wirować (256 g przez 3 minuty). Następnie usuwa się supernatant pozostawiając osad. Do osadu dodaje się płyn flotacyjny – Sheathers sugar (ciężar właściwy 1,27), następnie próbkę należy wymieszać i uzupełnić płynem flotacyjnym do uzyskania menisku wypukłego. Na probówce umieszcza się szkiełko nakrywkowe. Probówkę ze szkiełkiem nakrywkowym wiruje się (256 g przez 5 minut). Po zakończonym wirowaniu szkiełko nakrywkowe należy umieścić na szkiełku podstawowym i oglądać pod mikroskopem świetlnym. W celu obliczenia liczby form pasożytniczych w 1 g kału całkowitą liczbę jaj wykrytych należy podzielić przez 2.

Metoda McMastera w modyfikacji wg Raynaund [18]. Metody z użyciem komory McMastera występują w licznych wariantach i modyfikacjach. Są to najczęściej stosowane metody ilościowe w parazytologii weterynaryjnej. W modyfikacji wg Raynaud należy odważyć próbkę kału i wprowadzić do niej nasycony roztwór $MgSO_4$ w proporcji 14 ml $MgSO_4$ na 1 g kału. Zawiesinę miesza się za pomocą mieszadła magnetycznego, po czym należy ją przecedzić przez sito i ponownie mieszać na mieszadle. Tak przygotowana zawiesina jest wprowadzana do komory McMastera i do próbówki na szczycie, której umieszcza się szkiełko nakrywkowe. Zawartość komory McMastera jest badana pod mikro-

skopem świetlnym po 3 minutach, szkiełko nakrywkowe po 15–20 minutach. Liczbę form pasożytniczych obliczoną w jednej siatce należy pomnożyć przez współczynnik 100, w dwóch siatkach x50, w całej komorze x15, a na szkiełku nakrywkowym x7.

Metoda flotacji z użyciem Percoll'u [8]. Metoda służy głównie do badania kału o dużej zawartości tłuszczu (np. biegunkowy kał osesków). W celu wykonania badania należy 1–3 g próbkę kału wymieszać w 25% wodnym roztworze Percoll'u (ok. 10 ml). Mieszaninę przefiltrowuje się przez sito i przelewa do 15 ml probówki wirówkowej i wiruje (1700 g przez 5 minut). Po wirowaniu należy odrzucić supernatant z warstwą tłuszczu za pomocą pipetki pasterowskiej. Do probówki z pozostałym osadem dodać płyn flotacyjny (stężony roztwór NaCl z dodatkiem sacharozy: 1 l NaCl i 500 g cukru) – w proporcji 2 ml płynu, na 1 g kału i dokładnie wymieszać. Uzyskaną mieszaniną napełnia się komorę McMastera i po ok. 3 minutach ogląda się pod mikroskopem świetlnym. Metoda wymaga każdorazowej kalkulacji przeliczników w ramach walidacji wewnątrzlaboratoryjnej.

Metoda FECPAK [16]. Wykonując metodę należy odważyć do 10 g kału i dodać 3 części wody. Następnie próbę homogenizuje się i 30 ml zawiesiny dopełniania się nasyconym roztworem soli do objętości 230 ml. Zawiesina jest ponownie mieszana i przesączana przez sito. Następnie za pomocą pipetki pasterowskiej napełniana jest komora FECPAK. Jaja pasożytów są poszukiwane w obu siatkach komory. Liczbę jaj pasożytów w 1 g kału oblicza się mnożąc uzyskany wynik przez współczynnik 30.

Metoda FLOTAC [3]. Do odważonej próbki kału należy dodać wodę w stosunku 1:10 (np. do 1 g kału 9 ml wody) i rozdrobnić mikserem lub wymieszać za pomocą szpatuły. Następnie zawiesinę jest przesączana przez sito. Tak przygotowana próbka jest przelewana do probówki wirówkowej i wirowana (170 g przez 3 minuty). Po odwirowaniu płyn znad osadu jest usuwany, a w probówce pozostawiany jest sam osad. Do próbówki z osadem należy dodać płyn flotacyjny – dopełniając do 11 ml i wymieszać. Następnie wypełniane są obie komory aparatu za pomocą pipety pasterowskiej. Jedna komora aparatu FLOTAC ma 5 ml objętości. Dodatkowy 1 ml konieczny jest na wytworzenia menisku wypukłego w aparacie. Napełniony aparat umieszcza się w wirówce i wiruje (150 g przez 5 minut). Po wirowaniu następuje badanie próbki w aparacie pod mikroskopem świetlnym. Współczynnik do obliczenia liczby jaj pasożytów w 1 g kału dla jaj wykrytych w obu komorach aparatu wynosi 1. W przypadku liczenia form pasożytniczych jedynie w częściach siatki komory, współczynnik jest proporcjonalnie większy.

Metoda flotacji jaj nicieni sól-cukier SSF [12]. W metodzie SFF zważona próbka kału o masie do 6 g jest umieszczana w 50 ml probówce wirówkowej. Do próby dodawane jest 25 ml 13% roztworu NaCl. Probówka z zawartością jest wstrząsana w celu homogenizacji materiału. Zawiesina jest następnie przesączana przez sito do 50 ml probówki wirówkowej i jest wirowana (3600 g przez 5 minut). Po wirowaniu supernatant jest przelewany do drugiej probówki i do niego dodawana jest równa objętość wody. Zawiesina jest wstrząsana i wirowana (3600 g przez 1 minutę). Po odwirowaniu supernatant jest usuwany, a do osadu dodaje się 5 ml 17% roztworu sacharozy. Zawiesina jest mieszana i wirowana ponownie (3600 g przez 5 minut). Supernatant po wirowaniu jest przenoszony do innej probówki, do której wprowadzana jest równa objętość wody. Mieszanina jest następnie wstrząsana i wirowana (3600 g przez 5 minut), po czym supernatant jest ostrożnie usuwany, pozostawiając 200 µl osadu. Do pozostawionych 200 µl osadu dodaje się 3 krople nasyconego roztworu sacharozy i miesza się za pomocą pipety lub vortexu. Następnie każdy basenik 96-dołkowej płytki mikrotitracyjnej jest wypełniany trzema kroplami oleju mineralnego. Próbka jest wprowadzana do baseników pipetą automatyczną przez podwarstwienie pod warstwę oleju i pozostawiana na 15 minut, aby umożliwić jajom pasożytów koncentrację na powierzchni menisku. W celu obliczenia liczby jaj pasożytów wykonywane są za pomocą kamery mikroskopu zdjęcia zawiesiny jaj w basenikach płytki pod powiększeniem x30

SCT (sedimentation and counting technique) [7]. Metoda służy do wykrywania tasiemców z rodzaju *Echinococcus* w treści jelit zwierząt mięsożernych. Badane jelito jest rozcinane na fragmenty o długości ok. 20 cm i umieszczane w butelce o pojemności 1 litra wypełnionej płynem fizjologicznym. Butelka wraz z zawartością jest energicznie wstrząsana przez kilka sekund. Po wytrząsaniu fragmenty jelit są wyjmowane z butelki, jednocześnie przeciskając je między ramionami pensety w celu zdarcia powierzchni błony śluzowej. Treść jelita pozostawiona w butelce jest sedymentowana, co najmniej dwa razy przez 15 minut (aż supernatant będzie wystarczająco klarowny). Końcowy osad należy badać w małych porcjach na płytkach Petriego przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (powiększenie, co najmniej 15x).

Każda z opisanych metod składa się z wielu różnych etapów. Wszystkie one wpływają na ostateczną skuteczność metody. Do szczególnie istotnych należą: przygotowanie materiału, sposób izolacji form rozwojowych pasożytów, sposób liczenia form rozwojowych pasożytów pod mikroskopem świetlnym, właściwości badanego materiału. Na wiarygodność uzyskanych

wyników wpływa również sposób szacowania zawartości form rozwojowych pasożytów w próbce.

3. Przygotowanie preparatu do badania

W większości metod koproskopowych stosuje się zagęszczenie form rozwojowych pasożytów w badanej próbce i jednocześnie usuwa się z niej jak największą ilość cząstek pokarmowych. Pierwszym etapem przygotowania materiału do badań jest rozdrobnienie/homogenizacja próbki. W tym celu stosowane jest mieszanie na mieszadle magnetycznym (metoda McMastera w modyfikacji wg Raynaund), wstrząsanie próbki z perełkami szklanymi (metoda Stoll'a), użycie miksera lub mechaniczne mieszanie za pomocą szpatuły (metoda FLOTAC). Metody te wykazują nie jednakową przydatność w stosunku do kałów o różnej konsystencji. Zwłaszcza kał twardy i suchy wymaga dobrej homogenizacji. Dlatego manualne mieszanie próbki za pomocą szpatuły nie jest w tych przypadkach wystarczające. W niektórych metodach koproskopowych homogenizacja materiału jest uzyskiwana przez działanie na próbkę substancji chemicznych rozluźniając strukturę kału, np. NaOH – w metodzie Stoll'a, podchloryn sodu – metoda Caldwell'a.

Podchloryn sodu jest związkiem niezwykle aktywnym chemicznie i może powodować uszkodzenia delikatnych form rozwojowych pasożytów. Znaczenie ma także czas przygotowania materiału. Pozostawienie próbki przez długi czas w temperaturze pokojowej (jak w metodzie Stoll'a) może spowodować rozwój niektórych jaj pasożytów utrudniając ich identyfikację (np. w przypadku jaj węgorków wyklucie larw).

Kolejnym etapem wykonania w większości metod koporoskopowych jest filtrowanie badanej zawiesiny przez sito. Umożliwia to zatrzymanie cząstek o znacznych rozmiarach obecnych w kale. Jednak należy mieć na uwadze, że również część form pasożytniczych w trakcie filtracji pozostaje na sitach, co w niektórych przypadkach może to znacznie ograniczać skuteczność metody. Odwrotnie w metodzie Stoll'a i Caldwell'a próbka nie jest przesączana przez sito, przez co zminimalizowane są ewentualne straty poszukiwanych form pasożytniczych w trakcie przygotowania próbki, jednakże przygotowany preparat zawiera wiele zanieczyszczeń utrudniających badanie.

4. Izolacja form rozwojowych pasożytów

W metodach koproskopowych izolacja form pasożytniczych odbywa się za pomocą: technik flotacyjnych, sedymentacyjnych, oraz ich połączeń. Metody te mogą być także wspomagane przez wirowanie.

Najpowszechniej obecnie stosowane klasyczne metody parazytologiczne opierają swój mechanizm funkcjonowania o zjawisko flotacji. Flotacja polega na wypływaniu na powierzchnię płynu flotacyjnego form pasożytniczych o niższym ciężarze właściwym od ciężaru właściwego zastosowanego płynu. Płynami takimi są to najczęściej nasycone roztwory soli, np. NaCl (o ciężarze właściwym 1,20), $NaNO_3$ (c. wł. 1,20), $MgSO_4$ (c. wł. 1,28), $ZnSO_4$ (c. wł. 1,35), K_2HgI_4 (c. wł. 1,44), roztwory cukrów oraz mieszaniny roztworów soli i cukrów. Wraz ze wzrostem ciężaru właściwego rośnie siła wyporu działająca na formy pasożytnicze, ale także obecne w kale cząstki pokarmowe utrudniające badanie mikroskopowe. Ważne jest, więc dobranie w różnych metodach i ich modyfikacjach odpowiednich płynów flotacyjnych. Tradycyjnie w metodzie McMastera stosowany jest nasycony roztwór NaCl. Natomiast w modyfikacji metody McMastera wg Raynauda [18] do badania kału koni wskazane jest stosowanie $MgSO_4$ a dla owiec, świń i bydła K_2HgI_4. W metodzie SSF (salt-sugar flotation) do flotacji używany jest 13% roztwór NaCl, 17% roztwór cukru oraz nasycony roztwór cukru. W metodzie FLOTAC do wykrywania oocyst w kale bydła zalecany jest roztwór cukru i jodku rtęci (roztwór Rinaldi – c. wł. 1,25), a do wykrywania jaj *Anaplocephala* sp. – roztwór cukru i formaldehydu (roztwór Sheather's sugar – o c. wł. 1,20). Wymienione roztwory są odpowiednie do flotacji większości jaj pasożytów, wyłączając jaja przywr charakteryzujące się dużym ciężarem właściwym w stosunku, do których najczęściej stosuję się metody sedymentacyjne. Jednakże część autorów [3, 11] zaleca użycie do flotacji do wykrywanie jaj przywr nasycony roztwór $ZnSO_4$. Jaja przywr są jednak wrażliwe na wysokie ciśnienie osmotyczne (roztwory nasycone powodują ich uszkodzenia). Cringoli i wsp. [3] zwrócił uwagę, że podczas wykorzystania do diagnostyki jaj *Fasciola hepatica* – $ZnSO_4$ wykrywane są tylko otoczki jaj, co jednak wg autora nie stanowi problemu w diagnostyce. Wydaje się jednak, że ze względu na znaczne zmiany w morfologii jaj przywr pod wpływem wysokiego ciśnienia osmotycznego płynów flotacyjnych taka diagnostyka jest mało efektywna (trudności identyfikacyjne i możliwość pomyłki zniekształconych jaj z artefaktami). W wielu badaniach Raynaund [18] i Cringoli i wsp. [3] stosując nasycony roztwór K_2HgI_4 uzyskali najlepsze wyniki wykrywalności dla większości form rozwojowych pasożytów, jednakże ze względu na wysoką toksyczność tego odczynnika jego zastosowanie jest bardzo ograniczone. Również $NaNO_3$ jest płynem flotacyjnym o właściwościach toksycznych. Należy zwrócić uwagę, że w różnych laboratoriach mogą być stosowane w poszczególnych metodach koproskopowych różne płyny flotacyjne. Może to wpływać na skuteczność wykrywania form pasożytniczych. Taka zamiana wymaga, więc każdorazowo szerokiej rewalidacji metody.

Techniki sedymentacyjne wykorzystują zjawisko opadania form pasożytniczych obecnych w próbce kału w płynie o mniejszym ciężarze właściwym od ciężaru form rozwojowych pasożytów. Najczęściej przygotowywane są wodne zawiesiny kału, a w otrzymanym osadzie poszukiwane są formy rozwojowe pasożytów o dużym ciężarze właściwym. Istotne jest dobranie odpowiedniego czasu trwania sedymentacji. Zbyt krótki czas spowoduje, że wraz z wodą i cząstkami pokarmowymi usunięte będą duże ilości poszukiwanych form pasożytniczych. Natomiast zbyt długi czas sedymentacji spowoduje, że formy rozwojowe pasożytów opadną na dno naczynia z bardzo licznymi cząstkami pokarmowymi. Jest to jednak typowe, że w raz z formami pasożytniczymi w osadzie znajduje się wiele cząstek, które utrudniają badanie mikroskopowe. Dlatego w wielu metodach diagnostycznych sedymentacja funkcjonuje jako wstępny etap izolacji, po którym stosowana jest flotacja. Istnieją metody, dla których najbardziej efektywnymi formami izolacji są techniki sedymentacyjne np. metoda SCT. W metodzie SCT, w której sedymentacji podlega treść jelit w poszukiwaniu tasiemców z rodzaju *Echinococcus* sedymentacja jest jak do tej pory najbardziej optymalną formą izolacji.

W większości nowych modyfikacji metod koproskopowych występuje etap wirowania próbki. Wirowanie badanego materiału zapewnia znaczne zwiększenie skuteczności metody poprzez zwiększenie sił działających na formy pasożytnicze w trakcie izolacji. Próbę oceny przydatności wirowania w metodzie McMastera podjęli V a d l e j c h i wsp. [24]. Przeprowadzili oni badania porównawcze trzech modyfikacji metody McMastera na kale wzbogaconym znaną liczbą jaj nicieni *Teladorsagia circumcinata.* Modyfikacje posiadające etap wirowania uzyskały lepsze wyniki wykrywalności jaj nicieni w wyniku bardziej efektywnego procesu izolacji.

5. Sposób obliczania liczby form pasożytniczych pod mikroskopem świetlnym

Istotą parazytologicznego badania ilościowego jest obliczenie form rozwojowych pasożytów w określonej objętości próbki. Do precyzyjnego mierzenia tej objętości, a jednocześnie do ułatwienia obserwacji służą specjalne komory, choć możliwe jest wykonania takich badań także np. na szkiełku mikroskopowym. Przeprowadzenie badania na szkiełku podstawowym jak w metodzie Stoll'a, Caldwell'a oraz Wisconsin jest jednak mało dokładne ze względu, na trudności w precyzyjnym odmierzeniu badanego płynu (np. możliwość uzyskania różnej objętości słupa cieczy pod szkiełkiem) oraz brak linii ułatwiających obserwację (co może być przyczyną pominięcia niektórych form pasożytniczych podczas badania lub podwójnego zliczenia innych).

Bardziej precyzyjne badanie zapewnia użycie do diagnostyki komór obliczeniowych. Do wykonania najpopularniejszej parazytologicznej metody ilościowej stosowana jest komora McMastera. Obecnie na rynku znajdują się komory o różnej budowie. Standardowa komora McMastera ma całkowitą objętość 1 ml. Zbudowana jest z dwóch połówek o równej objętości 0,5 ml. Na każdej połowie znajduje się siatka o wymiarach 10×10 mm, a objętość zawierającego się pod siatką płynu wynosi 0,15 ml. P e r e c k i e n e i wsp. [14] przedstawili wyniki badania wykrywalności jaj *Asacris suum* w dwóch komorach McMastera: klasycznej (1 ml objętości) i zmodyfikowanej (1,5 ml objętości). Zgodnie z tymi wynikami większą skuteczność uzyskano stosując zmodyfikowaną komorę McMastera, co jest zrozumiałe ze względu na większą objętość badanej próbki. Istotną wadą komory McMastera w stosunku do badania na szkiełku podstawowym jest w wielu przypadkach brak możliwość prowadzenia obserwacji przy użyciu obiektywu o większym powiększeniu niż x20. Spowodowane jest to zbyt małą odległością roboczą obiektywów o większym powiększeniu (niż x20). Utrudnia to identyfikację form rozwojowych pasożytów.

Z kolei Metoda FECPAK opiera się o wykorzystanie zjawiska flotacji w komorze obliczeniowej FECPAK (Techion Group Ltd). Komora ta różni się od standardowej komory McMastera większą objętością. Jest ona przeznaczona szczególnie do badania kału przeżuwaczy. Objętość pod dwiema siatkami komory FECPAK wynosi 1 ml (dla porównania objętość cieczy pod dwoma siatkami komory McMastera – 0,3 ml). Presland i wsp. [16] wykonał porównanie metody FECPAK z metodą McMastera. Do próbek kału końskiego nie zawierającego jaj pasożytów wprowadzone zostały jaja węgorków w liczbie: 50, 100, 200 jaja na 1 g kału w celu porównania czułości metod. Obie porównywane metody zostały powtórzone 5 razy na każdym poziomie domieszkowania jaj. Metodą FECPAK uzyskano wynik pozytywny dla każdej domieszkowanej próbki. Natomiast dla metody McMastera uzyskano 6 wyników ujemnych (3 wyniki ujemne na poziomie 50 jaj na 1 g kału, 3 wyniki ujemne na poziomie 100 jaj).

Metoda FLOTAC opiera się na wykorzystaniu w badaniu specjalnego aparatu. Aparat FLOTAC zbudowany jest z dwóch komór o objętości 5 ml. Występuje on w dwóch wariantach: FLOTAC-100 i FLOTAC-400. Szczególnie ciekawą komorą jest FLOTAC-400, który umożliwia obserwację próby w mikroskopie świetlnym przy użyciu obiektywu o powiększeniu x40. Wynika to z niewielkiej grubości górnej ściany aparatu FLOTAC-400. Porównanie metody FLOTAC z metodą McMastera i z metodą flotacji w probówce m.in. dla jaj *Ancylostoma caninum* [2], *Dicrocoelium dendriticum* i *Moniezia expansa* [19] wykazało, że metoda FLOTAC charakteryzuje się lepszą wykrywalnością (co wynika za pewne ze zwiększonej

masy badanej próbki). Porównanie te wykonano jednak na materiale pochodzącym z naturalnego zarażenia, co uniemożliwia dokładną ocenę obu metod. Analizując komory obliczeniowe stosowane w metodach koproskopowych obserwuje się obecnie trend do zwiększania skuteczności metody poprzez wzrost objętości tych komór. Należy zauważyć jednak, że wzrost masy badanej próbki, przyczyniający się do zwiększenia skuteczności metody jednocześnie zwiększa pracochłonność badania.

Jak wspomniano, zbyt duża grubość materiałów z których wykonana jest większość komór obliczeniowych, utrudnia identyfikację pierwotniaków. Dlatego zastosowanie w koroskopowych badaniach ilościowych ma również komora Fuchs-Rosenthal'a stosowana także w badaniach hematologicznych. Na przykład V a r g a i wsp. [25] zalecają zastosowanie tej komory do ilościowej diagnostyki kryptosporydiozy. Komora ta pozwala na wykonanie badania pod większym powiększeniem niż jest to możliwe w przypadku komory McMastera. Jednak jednocześnie w komorze Fuchs-Rosenthal'a badana jest znacznie mniejsza objętość płynu niż w metodzie McMastera, co zmniejsza czułość metody. Dlatego ogranicznikiem zastosowania tej metody jest intensywność inwazji. W przypadku niskiej intensywności badanie to może dać wynik fałszywie ujemny.

Szczególnie ciekawe rozwiązanie dotyczące obliczania ilości jaj pasożytów w kale przedstawił M e s i wsp. [12] w metodzie SSF (salt-sugar flotation). W metodzie tej badanie wykonywane jest na płytce mikrotitracyjnej, której baseniki wypełniane są zawiesiną izolowaną z kału jaj pasożytów. Za pomocą kamery zintegrowanej z mikroskopem wykonywane są zdjęcia zawiesiny jaj, a z wykonanych zdjęć obliczana jest liczba jaj nicieni. Zaletą tej metody jest możliwość obliczania jaj pasożytów w dowolnym momencie po wykonaniu zdjęć. Natomiast w przypadku zdjęć o słabej jakości identyfikacja form pasożytniczych może być niewykonalna. Ponadto w przypadku analizy jaj pasożytów ze zdjęć brak jest możliwości zastosowania kontrastu, który można wykorzystywać podczas badania mikroskopowego. Należy podkreślić, że jest to metoda pracochłonna, wymagająca wielokrotnego wirowania i zastosowania różnych płynów flotacyjnych. Zatem wykorzystanie metody SSF w standardowej diagnostyce jest ograniczone.

6. Właściwości badanego materiału

Na skuteczność metody w istotny sposób wpływają również właściwości samego materiału podlegającego badaniu. W skład próbki wchodzą: kał i formy rozwojowe pasożytów.

Formy rozwojowe różnych rodzajów pasożytów zachowują się odmiennie podczas wykonywania samej metody. Na przykład jaja o dużym ciężarze właściwym jak *Trichuris* sp., *Taenia* sp. są wykrywane w mniejszych ilościach niż lżejsze jaja pasożytów np. *Ascaris suum* czy *Oesophagostomum* sp. Natomiast jaja *Toxocara* sp. mają specyficzną budowę otoczki, która odpowiada za silne właściwości adhezyjne [13]. Dlatego w trakcie wykonywania metody diagnostycznej jaja *Toxocara* sp. przytwierdzają się często do sprzętu i narzędzi, co powoduje obniżenie wykrywalności. W badaniach przeprowadzonych przez Kochanowskiego i wsp. [9] uzyskano znaczne różnice w wykrywalności metodą McMastera jaj pasożytów z rodzaju *Toxocara*, *Trichuris* i *Ascaris*. Najlepsze wyniki wykrywalności dla metody uzyskano w przypadku jaj *Ascaris suum*, nieco gorsze *Trichuris* sp., a znacząco najsłabsze *Toxocara* sp.

Wpływ na skuteczność metod koproskopowych mogą mieć także właściwości kału poddawanego badaniu. Na przykład badanie biegunkowego kału prosiąt ssących metodami koproskopowymi utrudnia znacząco tłuszcz wypływający na powierzchnię płynu flotacyjnego. Usunięcie frakcji tłuszczowej we wstępnej fazie badania za pomocą preparatu Percoll [8] umożliwiło uzyskanie kilkunastokrotnie niższej (lepszej) granicy wykrywalności niż standardową metodą McMastera. Ponadto, jak już wspomniano kał o zbitej strukturze jest trudno dokładnie rozdrobnić, a w przypadku materiału o dużej ilości cząstek pokarmowych wykonanie badania takiej próbki jest wymagające zastosowania różnych technik przygotowania próbki i izolacji form pasożytniczych. Tego typu zależności należy każdorazowo uwzględnić analizując wyniki badań koproskopowych.

7. Sposoby oceny parametrów charakteryzujących metody parazytologiczne

W literaturze standardy dotyczące oceny skuteczności parazytologicznej metody diagnostycznej są niejednoznaczne. Stąd autorzy w bardzo zróżnicowany sposób podchodzą do takich zagadnień jak: granica wykrywalności, czułość, liniowość, powtarzalność i odtwarzalność metody. Wiele prac opiera się jedynie na porównaniu metod bez charakterystyki parametrów przedstawiających rzeczywistą jej skuteczność [10, 23]. Przeważająca większość koproskopowych metod ilościowych (m.in. metoda McMastera, metoda Stoll'a, Caldwell'a, Wisconsin, FLOTAC, FECPAK) opiera swoje obliczenia ilości form rozwojowych pasożytów w kale o wartość obliczoną jako iloczyn liczby jaj wykrytych podczas badania i odpowiedniego współczynnika. Współczynniki do oszacowania liczby form pasożytniczych w kale są traktowane najczęściej jako wartości uniwersalne niezależnie od rodzaju pasożyta i wynikają ze stosunku rozcieńczenia badanej próbki i objętości badanego płynu. Wynika to z teoretycznego założenia, że wszystkie formy rozwojowe pasożytów w badanej masie próbki zostaną

wykryte. W praktyce jest to niezmiernie trudne do osiągnięcia. Zastosowanie takiego przeliczenia do oszacowania liczby form pasożytniczych w jednostce masy kału nie odzwierciedla realnej zawartości i nie zapewnia wiarygodnego wyniku badania ilościowego. Należy podkreślić, że badania nad skutecznością wielu metod [3, 15] przeprowadzone zostały na kale zwierząt z naturalnego bądź eksperymentalnego zarażenia o nieznanej zawartości form pasożytniczych. Badania wykonane na takim materiale nie umożliwiają realnej oceny zawartości jaj pasożytów w kale, a przez to skuteczności metody. Na przykład granica wykrywalności metody FLOTAC wg autora oszacowana została na 1 formę pasożytniczą (jajo, oocystę, cystę, larwę) w 1 g kału [3]. Została ona obliczona ze stosunku objętości płynu w obu komorach aparatu FLOTAC (10 ml) i masy próbki kału (1 g). Badania własne wskazują jednak, że wykrywalność metody jest wielokrotnie niższa (dane niepublikowane).

Rzetelna ocena skuteczności metody możliwa jest w przypadku badań przeprowadzonych na materiale o znanej zawartości form pasożytniczych. Materiał taki uzyskiwany jest najczęściej poprzez wzbogacanie matrycy konkretną liczbą jaj, cyst, oocyst, postaci dojrzałych, czy innych form pasożytów. Bazując na takim założeniu określona została skuteczność metody McMastera w modyfikacji R a y n a u d do wykrywania jaj pasożytów z rodzaju *Toxocara* i *Trichuris* w kale zwierząt mięsożernych [9]. Metodą McMastera przebadano próbki kału psiego domieszkowanego jajami z rodzaju *Toxocara* i *Trichuris*, a także jajami *Ascaris suum* (które stanowiły kontrolę wpływu właściwości jaj pasożytów na wynik). Na podstawie przekształconego równania linii trendu ilustrującej zależność liczby jaj wykrytych podczas badania od ilości jaj dodanych do próbki wyznaczono współczynniki do oszacowania realnej liczby jaj pasożytów w 1 g kału, w komorze McMastera. Dla jaj *Toxocara* sp. i *Trichuris* sp. współczynniki były wyższe od założeń określonych przez twórcę tej metody, a dla *A. suum* były z nimi porównywalne. Dla wszystkich trzech rodzajów jaj (*Toxocara* sp., *Trichuris* sp., *A. suum*) współczynnik proponowany przez Raynaud do obliczenia liczby jaj w wariancie z zastosowaniem flotacji w probówce był wielokrotnie zaniżony.

Nieadekwatność współczynników do ilościowej oceny form pasożytniczych w przypadku kału biegunkowego prosiąt wykazano w badaniach K a r a m o n a i wsp. [8]. W badaniach tych wykrywano pojedyncze oocysty *Isospora suis* dopiero przy wzbogaceniu próbek na poziomie 3200 oocyst w 1 g kału. Nawet po zastosowaniu zalecanego przez Raynaud dodatkowego współczynnika korekcyjnego dla kału biegunkowego oszacowana zawartość oocyst byłaby ponad trzydziestokrotnie zaniżona w stosunku do rzeczywistej.

Innym przykładem jest ilościowa metoda sedymentacyjna (sedimentation and counting technique, SCT) stosowana od wielu lat do wykrywania inwazji *Echinococcus* u zwierząt mięsożernych [6, 17], której faktyczne ograniczenia dotyczące wykrywalności określono dopiero w 2010 r. Badania przeprowadzone na próbach wzbogaconymi tasiemcami *Echinococcus multilocularis* wykazały, że granica wykrywalności tej metody wynosi 10 tasiemców *Echinococcus multilocularis* na jelito [7]. Uprzednio skuteczność metody SCT określano domyślnie jako „zbliżoną do 100%" [5]. Należy zaznaczyć, że metoda ta od wielu lat funkcjonuje jako „złoty standard" w wykrywaniu inwazji jelitowej tasiemców *Echinococcus*, a w stosunku do niej określane są skuteczności innych alternatywnych metod.

8. Podsumowanie

Mimo coraz szerszego wprowadzania do medycznej i weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej najnowocześniejszych metod molekularnych, ilościowe techniki koproskopowe pozostają wciąż podstawowymi metodami diagnostycznymi umożliwiającymi oszacowanie intensywności inwazji pasożytniczej. Należy jednak mieć na uwadze, że na wiarygodność wyników uzyskanych tymi metodami może wpływać wiele czynników wynikających zarówno ze złożoności samych metod jak i zmiennych cech badanego materiału.

Ilościowe techniki koproskopowe w większości są metodami sprawdzonymi, stosowanymi rutynowo od wielu lat. Pojawiają się też nowe techniki, będące modyfikacjami starych schematów. Modyfikacje te prowadzą do zwiększenia efektywności i precyzji metod m.in. poprzez zwiększenie masy badanej próbki, dokładne, zautomatyzowane przygotowanie preparatu oraz użycie nowoczesnych komór obliczeniowych.

Parazytologiczne, koproskopowe metody ilościowe obarczone są jednak pewnym wspólnym mankamentem. Ich głównym celem jest oszacowanie ilości form pasożytniczych w jednostce masy próbki. W tym celu stosowane są odpowiednie współczynniki, które powinny wynikać z przeprowadzonych badań na materiale zawierającym znaną liczbę form rozwojowych pasożytów. Współczynniki te ze względu na szereg czynników wpływających na skuteczność metody nie powinny być wartościami uniwersalnymi. Tymczasem dla większości metod współczynniki te obliczane są z uwzględnieniem jedynie wielkości badanej próbki i objętości komory obliczeniowej, podczas gdy skuteczność metody jest zazwyczaj parametrem całkowicie pomijanym. Stąd też istotne jest, że w diagnostycznych metodach parazytologicznych analiza skuteczności metody nie może być przeprowadzana w pełni na wzór metod mikrobiologicznych, serologicznych czy chemicznych, ponieważ parametry tych metod znacząco odbiegają od siebie wartościami i znaczeniem. Dlatego konieczne wydaje

się opracowanie specyficznych dla parazytologii sposobów walidacji metod ilościowych w celu precyzyjniejszej oceny rzeczywistej ich skuteczności. Wiąże się to także z koniecznością weryfikacji dotychczas wykorzystywanych sposobów kalkulacji wyników.

Piśmiennictwo

1. Boes J., Nansen P., Stephenson L.S.: False-positive *Ascaris suum* eggs counts in pigs. *Int. J. Parasitol.* **27**, 833–838 (1997)
2. Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Morgoglione M.E., Musella V., Utzinger J.: *Ancylostoma caninum*: Calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in fecal samples of dogs. *Exp. Parasitol.* **128**, 32–37 (2011)
3. Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J.: FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.* **5**, 503–515 (2010)
4. Cox, D.D., Todd, A.C.: Survey of gastrointestinal parasitism in Wisconsin dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **141**, 706–709 (1962)
5. Eckert J.: Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.* 85, 157–163 (2003)
6. Hofer S., Gloor S., Muller U., Mathis A., Hegglin D., Deplazes P.: High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, **120**, 135–142 (2000)
7. Karamon J., Sroka J., Cencek T.: Limit of detecion of sedimentation and counting technique (SCT) for *Echinococcus multilocularis* diagnosis, estimated under experimental conditions. *Exp. Pararistol.* **124**, 244–246 (2010)
8. Karamon J., Ziomko I., Cencek T., Sroka J.: Modified flotation method with the use of Percoll for the detection of *Isospora suis* oocysts in suckling piglet faeces. *Vet. Parasitol.* **156**, 324–328 (2008)
9. Kochanowski M., Dąbrowska J., Karamon J., Cencek T.: Analysis of the efficiency of the McMaster metod in Raynaud's modification in detection of *Toxocara* sp. and *Trichuris* sp. eggs in carnivores faeces. II Congress EAVLD. Kazimierz Dolny, Poland, S1-P-21 (2012)
10. Levecke B., De Wilde N., Vandenhoute E., Vercruysse J.: Field validity and feasibility of four techniques for the detection of *Trichuris* in simians: a model for monitoring drug efficacy in public health? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e366 (2009)
11. MAFF: Manual of Veterinary Parasitological Techniques. HMSO, London 1986.
12. Mes T.H., Eysker M., Ploeger H.W.: A simple, robust and semi-automated parasite egg isolation protocol. *Nat. Protoc.* **2**, 487–489 (2007)
13. Overgaauw P.A.M., van Knapen F.: Toxocarosis, an important zoonosis. *EJCAP*, **18**, 259–266 (2008)
14. Pereckiene A., Petkevicius S., Vysniauskas A.: Comparative evaluation of efficiency of traditional McMaster chamber and newly designed chamber for the enumeration of nematode eggs. *Acta Vet. Scand.* **52**(Suppl 1): S20 (2010)
15. Pereckiene A., Kaziūnaite V., Vysniauskas A., Petkevicius S., Malakauskas A., Sarkūnas M., Taylor M.A.: A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Vet. Parasitol.* **149**, 111–116 (2007)
16. Presland S.L., Morgan E.R., Coles G.C.: Counting nematode eggs in equine faecal samples. *Vet. Rec.* **156**, 208–210 (2005)
17. Rausch R.L., Fay F.H., Williamson F.S.: The ecology of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: *Taenidae*) on St. Lawrence Island, Alaska. II. Helminth population in the definitive host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 131–140 (1990)
18. Raynaud, J.P.: Etude de l'efficacited'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le controle des infestations parasitaires des bovins, ovins, equines et porcins. *Annales de Parasitologie* (*Paris*), **45**, 321–342 (1970)
19. Rinaldi L., Coles. G.C., Maurelli M.P., Musella V., Cringoli G.: Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* **177**, 345–352 (2011)
20. Roepstorff A.: Helminth surveillance as a prerequisite for anthelmintic treatment in intensive sow herds. *Vet. Parasitol.* **73**, 139–151 (1997)
21. Stefański W., Żarnowski E.: Rozpoznawanie inwazji pasożytniczych u zwierząt, PWRiL, Warszawa, 1971, s. 36
22. Stoll N.R.: Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. *Am. J. Hyg.* **3**, 59–70 (1923)
23. Turkson P.K., Ahafia K.K.: A comparison of modified McMaster and Brumpt's methods in assessment of nematode egg output in an N'dama cattle herd. *Acta Trop.* **57**, 341–344 (1994)
24. Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Cadkova Z., Jankovska I., Langrova I., Moravec M.: Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitol. Res.* **109**, 1387–1394 (2011)
25. Varga I., Sreter T., Bekesi L.: Quantitative method to assess *Cryptosporydium* oocyst shedding in the chicken model. *Parasitol. Res.* **81**, 262–264 (1995)

Autor: praca zbiorowa pod redakcją naukową
Jakuba Gołąba
Marka Jakóbisiaka
Witolda Laska
Tomasza Stokłosy
Tytuł: **Immunologia. Nowe wydanie.**
Redaktor PWN: **Krystyna Kruczyńska**
Projektant okładki: **Przemysław Spiechowski**
Wydawnictwo Naukowe PWN S.A.
Warszawa 2012
ISBN 978-03-01-17108-7

Recenzowany podręcznik jest kolejnym, uzupełnionym wydaniem znanego już podręcznika, wydawanego przez PWN w zakresie immunologii. Obecne wydanie, podobnie jak miało to miejsce w przypadku poprzednich, jest podręcznikiem akademickim przeznaczonym dla studentów wydziałów biologicznych i biotechnologicznych Uniwersytetów, studentów wydziałów weterynaryjnych i ootechnicznych Uniwersytetów Przyrodniczych i Akademii Rolniczych oraz studentów Uniwersytetów Medycznych. Prezentowany podręcznik jest najnowszym, uzupełnionym przez aktualne osiągnięcia naukowe źródłem podstaw immunologii. Tym razem podręcznik ma 22 autorów specjalizujących się w różnych dziedzinach współczesnej immunologii i mikrobiologii. Autorzy są przedstawicielami takich instytucji jak Akademia Medyczna czy Narodowy Instytut Zdrowia. Immunologia jest obecnie najbardziej dynamicznie rozwijającą się dziedziną biologii współczesnej, stad bardzo celowe jest ciągłe i częste uzupełniane zawartej w podręcznikach wiedzy. Dlatego też intencja autorów, tj. uzupełnienie dotychczasowej wiedzy poprzez zebranie najnowszych informacji z zakresu immunologii, była jak najbardziej wskazana. Ale, jak piszą redaktorzy, treści zawartych w podręczniku jako wytycznych aktualnych, szczególnie w zakresie nowych metod terapii czy diagnostyki, albowiem bardzo szybki postęp rozwoju nauk immunologicznych może powodować, iż niektóre informacje zawarte w podręczniku są już nieaktualne po skończonym procesie wydawniczym.

Treści zawarte w podręczniku zostały podzielone tym razem na 26 rozdziałów.

Część rozdziałów uległa połączeniu z innymi, część z nich jest rozwinięta o nowe informacje, część całkiem nowa. Każdy z rozdziałów, podobnie ja w wydaniu poprzednim, elementy układu immunologicznego, aby zakończyć dzieło immunohematologią, immunologią transplantacyjną czy immunologią nowotworów. Bardzo dobrym pomysłem jest stworzenie na końcu rozdziału dotyczącego zastosowania immunologii w nowoczesnej diagnostyce i badaniach naukowych. Duży pożytek z informacji zawartych w tym rozdziale będą mieli studenci czy doktoranci związani z biotechnologią czy biologią medyczną.

Wydanie 6 podręcznika akademickiego Immunologia z całą pewnością zapewni poznanie podstawowych pojęć i zdobycie obszernej wiedzy z dziedziny immunologii. Podręcznik wyróżnia się także świetną szatą graficzną Układ oraz dobór rycin i zdjęć zapewnia łatwiejsze zrozumienie opisywanych problemów i zasługuje na wyróżnienie. Pomysłowe, i można już powiedzieć tradycyjne w kolejnych wydaniach schematy, odpowiednio dobrane do prezentowanych treści naukowych, sprawiają, że podręcznik może też być źródłem informacji z zakresu immunologii dla szerokiej rzeszy Czytelników.

Prof. dr hab. Jacek Bielecki

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii nie drukowane w innych czasopismach oraz w dziale Nowości Wydawniczych recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły drukowane w *Postępach Mikrobiologii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu

1.1. Tekst

Prace należy przysyłać do Sekretariatu Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL na płytach CD lub DVD. Do dyskietki powinny być dołączone 2 egz. tekstu artykułu całkowicie zgodnego z zapisem elektronicznym. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być jednostronny (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5), z numeracją stron. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, adresy autorów i afiliacje, telefony oraz e-mail z zaznaczeniem autora korespondencyjnego, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przygotowane wg. wyżej wymienionych wytycznych należy przesłać na adres Redaktora Działu. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Na oddzielnej stronie należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (red. Witold Doroszewski, Halina Kurkowska, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1998) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac, napisanych w języku angielskim.

1.2. Ilustracje

Tabele i rysunki powinny być dostarczone w wersji elektronicznej oraz w formie wydruku z drukarki laserowej lub atramentowej. Maksymalne rozmiary rysunków planowanych w artykule w jednej szpalcie nie powinny przekraczać 7,5 cm × 16 cm (szer./wys.), a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt 11 cm × 21 cm (szer./wys.). Szerokość planowanych tabel nie powinna przekraczać rozmiarów rysunków (odpowiednio 7,5 cm lub 11 cm), a ich wysokość nie powinna być większa od 10 cm, niezależnie od zaplanowanej szerokości tabeli. **Podane wymiary rysunków obowiązują zarówno ilustracje wykonane i załączone w wersji elektronicznej i w papierowej.**

W maszynopisach nie należy pozostawiać wolnych miejsc na rysunki i zdjęcia, a tylko na kopii zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np. tab. 1, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załączyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą „objaśnienia w tekście". Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

1.2.1. Elektroniczne wersje ilustracji

Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako pliki PDF, ale w wersji ostatecznej do druku muszą być dostarczone jako pliki TIFF albo EPS. Pliki pochodzące z programu Power Point akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie rysunki (oprócz czarno białych z programu Power Point) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (ang. Cyan, Magenta, Yellow, blacK). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (ang. Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Pliki kolorowe sporządzone w programie Power Point nie są akceptowane z powodu różnic pomiędzy RGB i CMYK podczas wydruku.

Wszystkie grafiki należy przesyłać w 100% wymiarze bez konieczności skalowania. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje musza pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi.

Grafiki należy przesyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększania lub zmniejszania w Wydawnictwie. Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rysunków. Każdy rysunek musi być dołączony jako osobny plik, a rysunki wielo panelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman Pl, Arial, Arial Pl oraz Symbol. Dane są przyjmowane na standardowych mediach takich jak płyty CD lub DVD. Przesłane dyski nie będą zwracane autorom. Zalecaną przez redakcję kompresją informacji jest ZIP lub PKZIP (Windows). Redakcja nie akceptuje ilustracji wykonanych Microsoft Office, ponieważ są one zapisane w systemie RGB. Elementy rysowane, takie jak wykresy, formuły matematyczne czy diagramy nie powinny zawierać dodatkowych naniesień ręcznych i powinny być łatwo odtwarzane w dostępnych programach. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres: jbielecki@biol.uw.edu.pl.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowaną literaturę (Piśmiennictwo) należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony maszynopisu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona, i rok wydania (w nawiasie), np.

Arendsen A.F., Solimar M.Q. i Ragsdale S.W.: Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum. J. Bacteriol.* **181**, 1489–1495 (1999).

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora lub współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu stronę, np.:

Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E.: Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) Microbial Adhesion and Invasion, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer Verlag, New York, 1991, s. 86.

W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10, należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori. Nature*, **338**, 539–543 (1997) (wyżej cytowana praca jest dziełem 42 autorów)

Powoływanie się w tekście na pozycje cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach np. [10]. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.4. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Cytowanie danych z sieci internetowej może jedynie dotyczyć informacji pochodzących z prac oryginalnych zamieszczanych w sieci przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Redakcja będzie również uznawać cytacje informacji ze źródeł autoryzowanych przez uznane w środowisku autorytety z dziedziny nauk przyrodniczych. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania maszynopisu. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco: 14. XYZ Website 14 listopada 2004 roku (online), nazwisko wydawcy, jeśli jest znane, http://cbx.iou.pgr. (10 Października 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu). Cytowanie książek powinno zawierać szczegółowe dane o wydawnictwie. Cytacje prac oryginalnych przesyłanych poprzez sieć komputerową powinna zawierać następujące dane: nazwisko autora, inicjały imion, data przyjęcia pracy, tytuł pracy. Nazwa czasopisma, numer: strony (jeśli są dostępne) (online), adres internetowy, data potwierdzenia ważności adresu.

2. Prawo autorskie

Autorskie prawo osobiste (Ustawa z dn. 4-tego lutego 1994 r., Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.), zwane dalej w Informacji dla Autorów prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu – wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczania" utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów)
- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

Konieczność ochrony Autorskich praw osobistych innych Autorów przez Redakcję Postępów Mikrobiologii obliguje nas do przyjęcia następującej procedury:

(a) Reprodukcja utworów wytworzonych przez innych Autorów w pracy własnej, przesłane do opublikowania w *P.M.* tj. cudzych rysunków lub tabel – pochodzących z oryginalnej, pierwotnej pracy innego Autora/twórcy – bądź cytowanie fragmentów cudzego tekstu, wymaga od Autorów *P.M.* wcześniejszego uzyskania przez nich pisemnej zgody od Autorów pierwotnej pracy lub Wydawnictwa (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Zgodę tę w formie oryginalnego zaświadczenia należy przysłać wraz z materiałami reprodukowanymi do Redakcji *P.M.*

- Pod cytowanym rysunkiem należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy z której pochodzi rysunek oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.
- Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rysunkach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych rysunkach mogą wynikać z chęci Autorów *P.M.* do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na dokonanie zmian w reprodukowanym rysunku wynika z możliwości ingerencji Autorów *P.M.* w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję *P.M.* manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskryptem Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz w przypadku prac metodycznych Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów".

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją **ASM** – można znaleźć w **Instructions to Authors**, *J. Bacteriol., Jan. 2007*.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ("Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars" (M.Y. Popoff and L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and „Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme" (A.C. McWhorter-Murlin and F.W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki tj. *S. enterica* i *S. bongori* – pierwszy

* Fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *P.M.* za zgodą Journals Departments ASM.

z nich podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie posiadające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp, typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem (np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. enterica sv. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. sv. Typhimurium, bądź po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

3.2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Ww. określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp. *Genetics* **54** 61: 76, 1966.

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol+); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol–). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (StrS).

(b) Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą (np. *ara*, *his*, *rps*.). Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p*, *t* oraz *o* (np. *lacZp*, *lacZt*, *lacZo*; Bachman i Low; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56, 1980).

(c) Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie *plus* nad oznaczeniem genu np. *ara*+, *his*+, nie oznacza się natomiast zmutowaych alleli znakiem *minus*.

(d) Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawiania liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1*, *araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus , zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara*-23).

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami jak *plus*, dla typu dzikiego czy *minus* dla mutanta – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. $his_{E.coli}$ lub $his_{K\text{-}12}$. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; *glnA1* i *glnA2*.

(g) Delecję oznacza się symbolem, D usytuowanym przed zdelecjonowanym genem lub regionem np. D *trpA432*, *D(aroP--aceE)419*, lub D*his(dhuA hisJ hisQ)1256.* Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – F (ara-lac)1256. Podobnie F (*araB*'-lacZ+)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE)1*. Insercję genu his E. coli do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0 kb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12*hisB*)4.

Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F' 8(*gal*+).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:
- nazwy miar i wag regulowanych przez *Systeme International dc Unites* (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.
- skróty nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP, ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD+, NADH, NADPH, NADP+, poly(A), poly(dT) itp.,
- nazwy powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej np. PCR, SDS-PAGE, nazwy ogólnie znanych linii komórkowych np. HeLa, J774
- nazwy jednostek biologicznych; PFU (jednostka formowania łysinek), CFU (jednostka formowania kolonii), MIC (minimalne stężenia hamujące wzrost), itp.

Zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Research* 2003, **31**: 1805–1812. Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ, n oraz p dla wartości 10–3, 10–6, 10–9 oraz 10–12. Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza np. 37°C.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób 14CO2 , 3H2O, H235SO4. Taki sam sposób zapisu stosuje się gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np. 32S-ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np. 14C aminokwasy, 3H-liganty itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [14C] mocznik, L-[*metylo*-14C] metionina, [g –32P] ATP.

4. Procedura recenzowania i przyjęcia prac

Prace przysyłane do Redakcji w celu ich opublikowania w *Postępach Mikrobiologii* podlegają podwójnej ocenie tj. ich wartości merytorycznej (Recenzje) oraz poprawności pod względem redakcyjnym (układ pracy, język, załączniki ilustrujące tekst, oświadczenia autorów).

- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez dwóch stałych Recenzentów *P.M.* (lista Recenzentów, patrz Rada Redakcyjna jest również publikowana w każdym zeszycie *P.M.* oraz na stronie internetowej http:www.pm. microbiology.pl). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej *P.M.* Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub jego braku z innych ważnych przyczyn, Redaktor naczelny powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej.
- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego przygotowanych arkuszach

- Recenzenci nie otrzymują zapłaty od PTM za wykonaną pracę.
- Nazwiska Recenzentów z poza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane w każdym 4-tym zeszycie *P.M.* odpowiedniego roku.
- W przypadku negatywnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przeredagowania, Autor *P.M.* ma prawo odwołania się od tej sugestii do Redaktora naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent z poza Rady Redakcyjnej *P.M.*

5. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi jeden egzemplarz pracy oraz dyskietkę w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w maszynopisie pracy po piśmiennictwie. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. W razie nie przyjęcia pracy do druku Redakcja zwraca dyskietkę oraz jeden egzemplarz wydruku, drugi zatrzymuje u siebie. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Autorzy otrzymują bezpłatnie 15 odbitek pracy. Za prace opublikowane w Postępach Mikrobiologii nie przewiduje się honorariów autorskich. Prace należy nadsyłać na adres sekretarza naukowego redakcji:

Dr Bohdan Jerzy Starościak
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa
tel. (22) 628-08-22 lub 621-13-51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przeglądowe przygotowane zgodnie z wyżej wymienionymi zasadami należy przesłać na adres Redaktora Działu.

INFORMACJE DOTYCZĄCE PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

W dziale zatytułowanym **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY** publikowane są artykuły przeglądowe o charakterze metodycznym, reprezentujące dowolną dziedzinę mikrobiologii. Redakcja Postępów Mikrobiologii (PM), w porozumieniu z Zarządem Głównym PTM ustaliła, iż drukowanych będzie rocznie nie więcej niż cztery artykuły tej kategorii.

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba – Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej. Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel/fax (091) 46 616 51, 52, fax (091)46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci. pam.szczecin.pl**)

Prace metodyczne przeznaczone do druku podlegają ocenie dokonywanej przez stałych Recenzentów lub Ekspertów powoływanych każdorazowo przez Redaktora działu.

Lista stałych Recenzentów, patrz Zalecenia dla Autorów, pkt. 5.

Strona tytułowa każdego artykułu zaopatrzona będzie w informacje, iż praca należy do **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW** oraz każdorazowo podana będzie data otrzymania od Autorów manuskryptu jak i data zaakceptowania go do druku.

Zalecenia dla Autorów:

1. **Przesyłanie publikacji:**
   - Manuskrypt (w dwu egzemplarzach w formie papierowej oraz jednym egzemplarzu na nośniku elektronicznym wraz z rysunkami, tabelami itp.) proszę przesyłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
   - Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Autora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ew. faxu należy obligatoryjnie podać adres e-mail Autora korespondencyjnego.

2. Sposób przygotowania manuskryptu – Pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *Postępów Mikrobiologii*** (POST. MIKROB. 2009, **48**, 1, Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:
   - Objętość pracy nie może przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 20 stron maszynopisu.
   - Ilość cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
   - W spisie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopismach naukowych, niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.

3. **Prawa autorskie** – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **Oświadczenie dotyczące praw autorskich.** Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *P.M.*

4. **Zalecenia i uwagi dodatkowe:**
   W celu uniknięcia kryptoreklamy, proszę o zwrócenie szczególnej uwagi na sposób przedstawienia czytelnikom produktów komercyjnych lub metod opracowanych przez producentów. Autorzy są również zobowiązani do ujawnienia (jeżeli takie istnieją) wszelkich powiązań (honoraria, granty, płatne ekspertyzy lub inne formy uzyskiwania korzyści osobistych) między Autorami a firmą, której produkt ma istotne znaczenie w nadesłanej pracy. W tym celu każdy z Autorów proszony jest o złożenie Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów". Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje. Wzór deklaracji można pobrać ze strony internetowej *PM*.
   - Redakcja *PM* zastrzega sobie prawo ostatecznej decyzji o akceptacji pracy przeznaczonej do druku w dziale **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY.**
   - Wszelkie proponowane zmiany w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *P.M.*** zostaną przedstawione PT Czytelnikom *Postępów Mikrobiologii* przed ich wprowadzeniem.

5. Stali recenzenci działu **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY:**

Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)
Waleria Hryniewicz
(Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)
Józef Kur (Politechnika Gdańska)
Anna Przondo-Mordarska
(Akademia Medyczna we Wrocławiu)

[Wzór]

Oświadczenie o oryginalności pracy

. . . .
Nazwisko i imię autora (korespondencyjnego)

. . . .

. . . .
Tytuł pracy

. . . .
Data złożenia pracy w Redakcji *Postępów Mikrobiologii*

Oświadczam, że złożona przeze mnie praca, zatytułowana jak wyżej, jest moim oryginalnym utworem i stanowi przedmiot prawa autorskiego w myśl Ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dn. 4 lutego 1994 r.

Oświadczam również, że praca ta ani w całości, ani we fragmentach nie została opublikowana wcześniej w żadnym innym czasopiśmie lub wydawnictwie naukowym. Dodatkowo stwierdzam, iż w/w pracy nie wysłano równolegle do opublikowania w innym czasopiśmie naukowym lub wydawnictwie.

Warszawa, dnia . . . .

. . . .
– podpis Autora korespondencyjnego –

– –

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1. . . . .

. . . .
(nazwisko/a i imię/ona autora/ów – proszę podkreślić autora korespondencyjnego)

Adres autorów: . . . .

. . . .

Tytuł pracy: . . . .

2. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b)

(a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania rysunki oraz tabele, są dziełem mojej/naszej oryginalnej twórczości (tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu), nie są obciążone jakimikolwiek prawami osób trzecich, ani nie naruszają jakichkolwiek przepisów prawa i interesów dóbr osób trzecich. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji/ ewentualnie w pracy zamieszono cytaty w ramach dozwolonego prawnie prawa cytatu, przy czym wszystkie zamieszczone cytaty zostały należycie oznaczone wraz z wymienieniem twórcy i źródła cytatu.

. . . .
(miejsce, data)   (podpis korespondencyjnego autora)

(b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję rysunków

nr: . . . . , zamieszczonych w: . . . .

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję tabel

nr: . . . . , zamieszczonych w: . . . .
(* podać bibliografie prac oryginalnych z których reprodukowane będą rysunki lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie: . . . .

rysunków: . . . . tabel: . . . . cytowanego tekstu: . . . .

. . . .
(miejsce, data)   (podpis korespondencyjnego autora)

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące „konfliktu interesów”[1]

1. Nazwisko i imię autora: .....

2. Tytuł pracy: .....

.....

.....

3. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b, niepotrzebne skreślić)

(a) Oświadczam, że „konflikt interesów” nie występuje

(b) Oświadczam, że występuje „konflikt interesów”, który polega na: .....

.....

....
(miejsce, data) (podpis korespondencyjnego autora)

[1] Konflikt interesów występuje, kiedy autor lub zakład pracy autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje.

Od Redakcji

Uprzejmie proszę PT. autorów o możliwie szybkie uregulowanie zaległych opłat za publikowanie artykułów w *Postępach Mikrobiologii.*
Z góry dziękujemy za pozytywny odzew na naszą prośbę.

Za Redakcję *PM.*
Jerzy Hrebenda

INFORMACJA DLA AUTORÓW
o opłatach za prace publikowane w Postępach Mikrobiologii

Uprzejmie informujemy PT Autorów PM, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku oraz z dnia 2 marca 2011 r. wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym piśmie. Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat w wysokości 250 PLN + VAT 23% – razem 307,50 PLN za każdy artykuł na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

Bank Pekao S.A. 18 1240 5992 1111 0000 4774 7434.

Opłatę można wnosić indywidualnie. W tym przypadku dowód wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. W imieniu Autorów opłatę może wnosić sponsorująca instytucja, fundacja itp. Wtedy Autorzy zobowiązani są do złożenia w Redakcji wraz z manuskryptem pisemnego zobowiązania się do bezzwłocznej opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT. Należy dodatkowo:

- **Przesyłać zgłoszenia** proponowanych do publikacji artykułów wraz z danymi do wystawienia faktury VAT (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej) na nr faksem (022) 841-29 49, lub drogą pocztową na adres siedziby Zarządu PTM: 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34.
- Do dowodu wpłaty lub zobowiązania zapłaty **dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego.**

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z kopią potwierdzenia wpłaty lub zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.
W przypadku nie przyjęcia przez Redakcję do druku pracy zwrot opłaty wraz z korektą faktury dokonany będzie przez księgowość PTM.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25-ciu stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron maszynopisu.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony maszynopisu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplemencie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przesyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology* (*Acta Microbiologica Polonica*) lub innego czsopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub Komitet Mikrobiologii PAN, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Zespół Redakcyjny *Postępów Mikrobiologii*.

Oferta Reklamy

Postępy Mikrobiologii udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowi instytutów badawczych, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:
1/2 strony 250,– zł
cała strona 500,– zł
Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji Postępów Mikrobiologii, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 628 08 22.

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń

Uprzejmie informujemy PT Czytelników, że od września 2008 roku na stronie internetowej *Postępów Mikrobiologii* działa wyszukiwarka. Umożliwia ona odnajdywanie informacji zarówno w bieżących jak i archiwalnych zeszytach naszego pisma.

Redakcja i Administrator Strony Internetowej

SPIS TREŚCI

Prof. dr hab. med. Felicji Meisel-Mikołajczyk 1927–2012 3
Prof. dr hab. med. Mieczysław Janowiec 1921–2012 5
D. Lewandowski, A. Urbanowicz, M. Figlerowicz – Molekularne podłoże oddziaływań pomiędzy *Borrelia burgdorferi*, kleszczem i kręgowcem 9
M. Dunal, A. Trzcińska, J. Siennicka – Wirus cytomegalii – problem zakażeń wrodzonych 17
K. Markowska, A. M. Grudniak, K. I. Wolska – Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe: podstawy technologii, jej ograniczenia i potencjalne zastosowania 29
M. Łysakowska, M. Bigos, M. Wasiela – Budowa, regulacja i znaczenie czynników wirulencji szczepów *S. agalactiae* 41
M. Bednarska – Mikrosporydia: oportunistyczne patogeny ludzi 53
A. Domańska, M. Godlewski – Szlak sygnalizacyjny cAMP u sinic 65
J. Solecka, J. Ziemska, A. Rajnisz, A. Laskowska, A. Guśpiel – Promieniowce – występowanie i wytwarzanie związków biologicznie czynnych 83
M. Wiciński, P. Sopońska, B. Brzoszczyk, B. Malinowski, E. Grześk, A. Michalska – Rola czynników zakaźnych w chorobach neurodegeneracyjnych 93
B. Tokarz-Deptuła, J. Śliwa-Dominiak, M. Kubiś, W. Deptuła – Mimiwirus APMV, mamawirus oraz jego wirofag – budowa i charakterystyka 105

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

M. Kochanowski, J. Karamon, J. Dąbrowska, T. Cencek – Koproskopowe metody ilościowe w weterynaryjnej diagnostyce parazytologicznej zastosowanie i problemy w szacowaniu ich skuteczności 111

INFORMACJE KOMUNIKATY RECENZJE 119

CONTENTS

Prof. dr hab. med. Felicji Meisel-Mikołajczyk 1927–2012 3
Prof. dr hab. med. Mieczysław Janowiec 1921–2012 5
D. Lewandowski, A. Urbanowicz, M. Figlerowicz – Molecular interactions between *Borrelia burgdorferi* ticks and mammals 9
M. Dunal, A. Trzcińska, J. Siennicka – Cytomegalovirus – problems due to congenital infection ... 17
K. Markowska, A. M. Grudniak, K. I. Wolska – Microbial fuel cells: rationale, limitations and potential applications of the technology 29
M. Łysakowska, M. Bigos, M. Wasiela – The structure, regulation and the importance of *S. agalactiae* virulence factors 41
M. Bednarska – Microsporidia – opportunistic pathogens of humans 53
A. Domańska, M. Godlewski – cAMP signaling pathway in *Cyanobacteria* 65
J. Solecka, J. Ziemska, A. Rajnisz, A. Laskowska, A. Guśpiel – Actinomycetes – occurrence and production of biologically active compounds 83
M. Wiciński, P. Sopońska, B. Brzoszczyk, B. Malinowski, E. Grześk, A. Michalska – Role of infections factors in neurodegenerative diseases 93
B. Tokarz-Deptuła, J. Śliwa-Dominiak, M. Kubiś, W. Deptuła – APMV, Mimivirus mamavirus and its virophage – structure and characteristic 105

METHODS AND STANDARDS

M. Kochanowski, J. Karamon, J. Dąbrowska, T. Cencek – Coproscopical quantitative methods in the parasitological diagnosis – the use and problems with estimation of their efficiency 111

INFORMATION, NEW REPORTS, BOOKS REVIEWS 119