Kwartalnik
Tom 60
Zeszyt 1•2021
STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:
PMKMAV 60 (1)
2021

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Impact Factor = 0,263 (2019)
Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOSŁAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

JAROSŁAW A. PANKOWSKI (Sekretarz)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski)
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM)
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324; fax 91 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki z rodzaju *Yersinia*.
Preparatyka: dr Jagoda Płaczkiewicz i dr hab. Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii Molekularnej,
Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Instytut Paleobiologii PAN Polskiej Akademii Nauk.
Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

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

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

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 3–12
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.01

SELECTED ASPECTS OF THE CRISPR-CAS BIOLOGY AND APPLICATIONS

Monika Wawszczak, Aneta Filipiak, Michał Majchrzak, Stanisław Głuszek, Wioletta Adamus-Białek*

Department of Surgical Medicine with the Laboratory of Medical Genetics, Collegium Medicum, Jan Kochanowski University, IX Wieków Kielc 19A Av., 25-317, Kielce, Poland.

Received in May, accepted in November 2020

Abstract: The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated proteins are components of the adaptive immunity system, protecting against foreign DNA, which are present in many bacteria species. Recent years have brought extensive research on this system however, not all of its biological properties have been discovered so far. It was recently discovered that CRISPR-Cas can regulate the formation of biofilm and is closely associated with the DNA repair system in bacterial cells. It is also likely that some of the spacer sequences are complementary to short sequences in the bacterial genome, which may have an influence on regulation of bacterial genes, e.g. virulence factors. Besides, phages can synthesize anti-CRISPR genes, which could be of use in the future for the purpose of development of an alternative therapy against multi-drug resistant bacterial strains. Here we present an elementary characteristic of CRISPR-Cas system, including the structure and the brief mechanism of action, systematic classification and its importance for medicine and biotechnology issues. We would like to stress the huge potential of CRISPR-Cas by discussing the selected but varied aspects.

1. Introduction. 2. Structure, operation and differences. 3. Bacterial typing. 4. Correlation with bacterial pathogenicity. 5. Potential tool for medicine. 5.1. CRISPR-tool for genome editing. 5.2. Instances of CRISPR-tool strategies in medicine. 6. Phage response. 7. Conclusions

WYBRANE ASPEKTY BIOLOGII I ZASTOSOWAŃ CRISPR-CAS

Streszczenie: Zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (CRISPR) i białka związane z CRISPR są składnikami systemu odporności wielu gatunków bakterii na obcy DNA. W ostatnich latach prowadzone są obszerne badania nad tym mechanizmem, ale jeszcze nie wszystkie jego właściwości biologiczne zostały odkryte. Niedawno udowodniono, że CRISPR-Cas może regulować tworzenie biofilmu i jest ściśle powiązany z systemem naprawy DNA w komórkach bakteryjnych. Jest również prawdopodobne, że niektóre sekwencje rozdzielające są komplementarne do krótkich sekwencji w genomie bakterii, co może mieć wpływ na regulację ekspresji genów bakterii kodujących np. czynniki wirulencji. Poza tym fagi mogą zawierać geny anty-CRISPR, które mogłyby zostać wykorzystane w przyszłości do opracowania alternatywnej terapii przeciwko wielolekoopornym szczepom bakterii. W tym przeglądzie przedstawiamy zwięzłą charakterystykę systemu CRISPR-Cas, w tym budowę i mechanizm działania, klasyfikację oraz jego medyczne i biotechnologiczne znaczenie. Omawiając wybrane i różnorodne aspekty chcemy podkreślić ogromny potencjał CRISPR-Cas.

1. Wprowadzenie. 2. Struktura, mechanizm i różnice. 3. Typowanie bakteryjne. 4. Korelacje w patogennością bakterii. 5. Potencjalne zastosowania w medycynie. 5.1. Narzędzie „CRISPR" w medycynie. 5.2. Przykłady wykorzystania systemów CRISPR w medycynie. 6. Odpowiedź fagowa. 7. Wnioski

Key words: CRISPR, Cas, bacterial pathogenicity, anti-CRISPR proteins, genome editing
Słowa kluczowe: CRISPR, cas, patogenność bakteryjna, białka anty-CRISPR, edycja genomu

1. Introduction

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) were identified in approximately 40% of bacterial and approximately 90% of archaeal genomes [1]. These loci are usually accompanied by conserved sets of genes, encoding nucleic acid processing enzymes like nuclease or helicase proteins, named CRISPR-associated (*cas*) genes. Typically, CRISPR-Cas loci contain repeats of sequences interspaced by spacers with noncoding unique sequences of similar lengths [2–5]. The function of CRISPR-Cas as part of a defense system against foreign DNA was confirmed in 2007 [6]. Functionally, the CRISPR-Cas system is based on molecular memory of a previous infection, which means that during second contact with a bacteriophage or other mobile genetic material, the foreign nucleic acid is recognized and inactivated.

The CRISPR sequences were previously classified as a group of interspaced short sequence repeats (SSRs) with a unique structure. Those repeats are interspaced by nonrepetitive DNA fragments, which, as was thought at the beginning, were not important. These distinct interspaced SSRs were detected for the first time in the *Escherichia coli* K-12 chromosome in 1987 [7]. In subsequent years, many scientists have identified this specific group of SSRs in many other bacteria, e.g. *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter*

* Corresponding author: wioletta.adamus-bialek@ujk.edu.pl, phone number 788 860 604

jejuni, and *Clostridium difficile* [4, 8, 9]. The function of SSRs was unknown and many scientists have named the same group of sequences differently. In 2002 Jansen *et al.* [4] used the acronym CRISPR for the first time as a name for a characteristic class of repetitive DNA, to avoid confusing nomenclature in the future. After the discovery of the CRISPR sequence function, the CRISPR-Cas designation has become a part of the generally accepted nomenclature. Interestingly, before recognition of the biological role of CRISPR-Cas, these sequences were used as a typing tool in molecular diagnostics. The method was established for *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Francisella tularensis*, *E. coli* O157, and *Mycobacterium leprae* [10]. Currently, scientists have isolated several subgroups that differ in the internal structure of CRISPR-Cas sequences and associated genes [11–14]. In this work we present a brief history of CRISPR-Cas, describing the structure and the mechanism of operation as well as its application on selected examples.

2. Structure, operation, and differences

The CRISPR-Cas system is based on the involvement of small, noncoding sequences in conjunction with Cas proteins. It was found that *cas* genes are always located near a CRISPR locus and the most common arrangement of these genes is *cas3-cas4-cas1-cas2*. The Cas3 protein appears to be a helicase, whereas Cas4 resembles the RecB family of exonucleases and contains a cysteine-rich motif, which suggests DNA binding properties. Cas1 is generally highly conservative and it was found consistently in all species that contain CRISPR loci. Repeated sequences in size from 24 to 48 nucleotides are separated by unique spacers of similar length. The number of repeated sequences is highly variable in bacterial species [11, 15, 16].

The classification of CRISPR-Cas systems is complex and still not obvious. However, three basic stages of the mechanism of action of the CRISPR-Cas defense system are established, namely: a) spacer integration, b) expression of CRISPR locus and *cas* genes, and c) target recognition and neutralization are more or less conserved among all CRISPR types and hence can be described in general [16]. In this work the CRISPR-Cas type II system is used to illustrate in detail this model of operation – a clue for developing a CRISPR genome editing technique [17, 18]. The first step of this mechanism runs with the integration of short sequences of foreign DNA into the CRISPR locus (Fig. 1). Identification of foreign DNA begins with recognition of the viral protospacer adjacent motif (PAM) via the protein complex of two Cas1 dimers and a single Cas2 dimer.

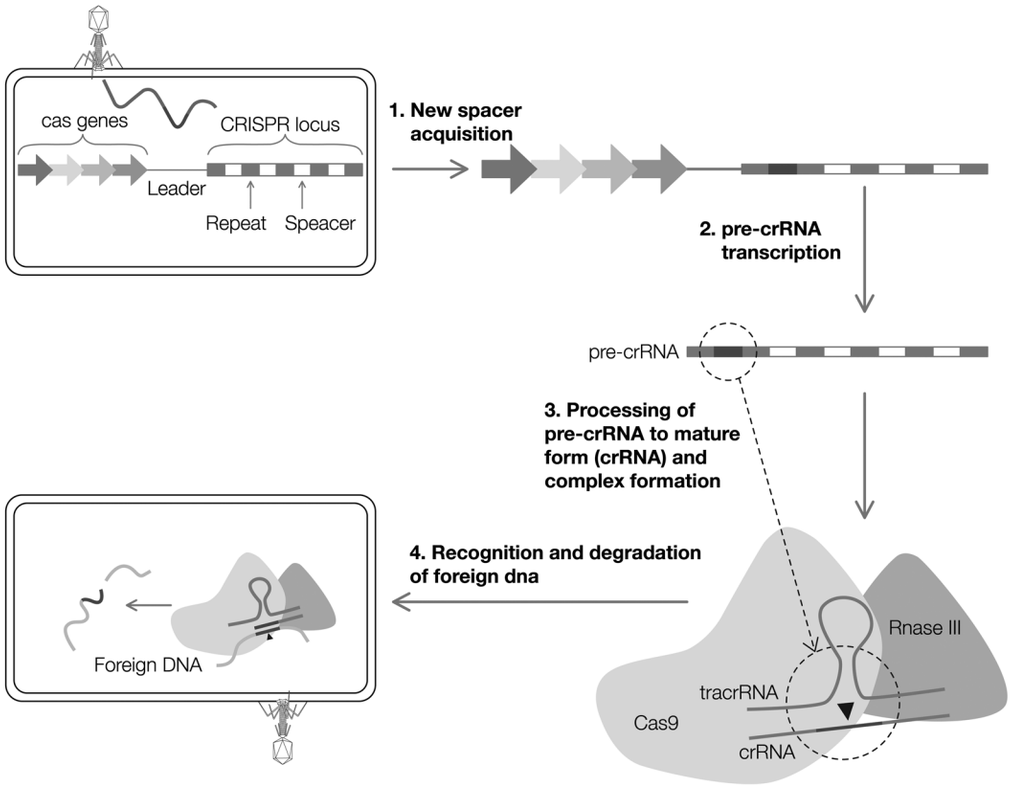


Fig. 1. The type II system as an example of mechanism of CRISPR-Cas action-prepared on the basis of Nishimasu *et al.* [90] and Amitai *et al.* [91] .

PAM is a short sequence consisting of 2–8 nucleotides and flanking the protospacer, where the Cas1 protein is an endonuclease and the Cas2 is an endoribonuclease. These properties allow the Cas1-Cas2 complex to cut off the protospacer and integrate with the CRISPR array. Before the integration of the new spacer, specific enzymes cut the sequence and create its sticky ends. This mechanism allows integration of the new spacer between the first and second repeats on the leader sequence side. During integration, DNA breaks at two points, on the 5' end of the first repeat and next on the 5' end on the opposing side of the repeat. As a result, the arisen single-stranded DNA (ssDNA) contains the repeated sequence. In the next step, specific enzymes repair gaps in the ssDNA [19]. During the expression stage, the CRISPR region with acquired foreign sequences is transcribed into a precursor RNA transcript and then is cut by the double-stranded RNA-specific RNase III into specific small RNA molecules (crRNAs) [20]. The maturation of crRNA is possible due to a small sequence of trans-activating crRNA (tracrRNA) (Fig. 1). The tracrRNA is complementary to pre-crRNA and thus these two molecules form a duplex. Each mature crRNA contains a fragment of a single spacer flanked by part of the repeated sequence [20]. In the recognition stage, a complex of crRNA and Cas9 protein scans the cell for foreign nucleic acid targets. This tracing process is ensured by a complementarity of crRNA and foreign DNA which allows recognition and incorporation of the protein complex. This complex contains the Cas9 enzyme which cuts foreign DNA at the attachment site and leads to its degradation (Fig. 1) [20, 21]. It was shown that deletion or insertion of the new spacer sequence complementary to phage genome increases or decreases the bacterial sensitivity to phage infection, respectively [6].

The first polythetic CRISPR-Cas system classification was proposed by Makarova *et al.* (2011) [5]. In this study, CRISPR-Cas systems were differentiated according to target molecule and mode of operation. In this classification, three major types and 12 subtypes were distinguished. Type I and II systems split and degrade DNA. The main difference between type I and type II systems is the presence of various proteins in the complex, Cas3 and Cas9, respectively. The CRISPR-Cas type III contains Cas10 protein and cleaves both DNA and RNA [23]. Both type I and II require two principal factors to effectively target the DNA. The first is a CRISPR RNA spacer complementary to the target protospacer sequence. The second is a PAM sequence specific to each CRISPR-Cas system. Similar factors are required for DNA targeting by type III systems. All these systems involve base pairing between the target sequence and the region flanking the protospacer [24]. The CRISPR-Cas type III system seems to be more beneficial for bacteria because of its various abilities to recognize and degrade both DNA and RNA. Therefore, it is effective against a wider group of phages. Otherwise, the type I and type II systems are simpler because of the smaller number of Cas proteins engaged. Those mechanisms require less energy from bacteria to transcribe and run the mechanism. This may allow for a faster response and defense in case of a phage infection. This classification of CRISPR-Cas systems was updated by Makarova *et al.* in 2015 and again in 2020 [13, 25]. The fast evolution and major achievements in the study of the diversity of the CRISPR-Cas systems lead to the creation of its robust classification which is essential to understanding their functionality in microorganisms and utility as genome-editing tools. Recently, authors put special emphasis on the classification of the quickly proliferating class 2 variants. In comparison with the previous classification system (from 2015), the new class 2 includes 3 types (II, V, VI) and 26 subtypes. Interestingly, the previous type IIC was divided into two extra subtypes (IIC1 and IIC2) and type V was described in detail (17 subtypes were found). Moreover, the new type VI was distinguished. The newest classification is shown in Table I.

The origin and cause of the system's mechanism diversity are still unexplained. An interesting task now would be to determine which of the systems was created first, or if they were developed independently of each other.

3. Bacterial typing

Primarily, CRISPR sequences have been used as a typing tool in epidemiology and phylogenetic studies. The main elements useful for analysis are the palindromic repeats. The nucleotide sequence, length, and loci are highly variable and often strain specific among some bacterial species such as *M. tuberculosis*, in which CRISPR-Cas type III-A has been described [8, 10, 26, 27]. Due to this, the CRISPR-based approach has already been used for the differentiation of many bacterial species such as *M. tuberculosis* [28], *C. jejuni* [29], *Corynebacterium diphtheria* [30], *Legionella pneumophila* [31], and *E. coli* [32]. This CRISPR utility in bacterial differentiation may be associated with their diverse pathogenicity profile and the unique genetic fingerprints of particular strains. Because of their unique structure, CRISPR sequences can be used for clonal differentiation [33, 34]. As a result of optimization, a technique called CRISPR high-resolution melt analysis was developed. This method is a combination of CRISPR typing with amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and multilocus sequence typing (MLST) [29, 34]. Unfortunately, there are limitations

Table I
The new classification of CRISPR-Cas systems proposed by Makarova *et al*., 2020

	Type	Subtype	Genes included	Bacterial species
Class 1	I	I-A	cas1, cas2, cas3', cas3", cas4, cas5, cas6, cas7, cas8a1, csa5	*Archaeoglobus fulgidus*
		I-B	cas1, cas2, cas3, cas4, cas5, cas6, cas7, cas8b1	*Clostridium kluyveri*
		I-C	cas1, cas2, cas3, cas4, cas5, cas7, cas8c	*Bacillus halodurans*
		I-D	cas1, cas2, cas3', cas3", cas4, cas6, cas10d, csc1, csc2	*Cyanothece* sp. 8802
		I-E	cas1, cas2, cas3, cas5, cas6, cas7, cse1, cse2	*Escherichia coli* K-12
		I-F1	cas1, cas2, cas3, cas6f, csy1, csy2,csy3	*Yersinia pseudo-tuberculosis*
		I-F1	cas1, cas2, cas3, cas6f, csy1, csy2,csy3	*Yersinia pseudo-tuberculosis*
		I-G	cas1, cas2,cas3, cas4, cas5, cas5, cas7, cas8u2	*Geobacter sulfurreducens*
	III	III-A	cas1, cas2, cas10, cas6, csm2, csm3, csm4, csm5, cms6	*Staphylococcus epidermidis*
		III-B	cas6, cas10, cmr1,cmr3, cmr4, cmr5, cmr6	*Pyrococcus furiosus*
		III-C	cmr1,cmr3, cmr4, cmr5, cmr6, cas10	*Methanothermobacter thermautotrophicus*
		III-D	cas10, cas7, csx10, csm2, csm5, all1473	*Synechocystis* sp.6803
		III-E	TPR+caspase, cas7(3), csm3, csm2, csm5, cas1, cas2, reverse transcriptase	*Candidatus Scalindua brodae*
		III-F	cas10, cas5, cas11, csm3	*Thermotoga lettingae*
	IV	IV-A	csf4, csf5, csf1, csf2, csf3,	*Thioalkalivibrio* sp. K90mix
		IV-B	cysH-like, csf1, cas11, csf2, csf3	*Rodococcus jostii* RHA1
		IV-C	large subunit, cas11, csf2, cas5	*Thermoflexia bacterium*
Class 2	II	II-A	cas1,cas2, cas9,csn2,	*Streptococcus thermophilus*
		II-B	cas1, cas2,cas4, cas9	*Legionella pneumophila* str. Paris
		II-C1	cas1, cas2, cas9	*Neisseria lactamica*, 020-06
		II-C2	cas1, cas2, cas4, cas9	Micrarchaeu acidiphilum ARMAN-1
	V	V-A	cas1, cas2, cas4, cpf1	*Francisella cf. novicida* Fx1
		V-B1	cas1, cas2, cas4, c2c1	*Alicyclobacillus acidoterrestris*
		V-B2	cas1, cas2, cas4, cas12b2	*Planctomycetes bacterium* RBG_13_46_10
		V-C	cas1, c2c3	*Oleiphilus* sp.
		V-D	cas1, casY,	*Bacterium* CG09_39_24
		V-E	cas1, cas2, cas4, casX	*Deltaproteobacteria bacterium*
		V-F1	cas1, cas2, cas4, cas14a	*Uncultured archaeon*
		V-F1(V-U3)	c2c10,	*Bacillus thuringjensis* HD-771
		V-F2	cas1, cas2, cas4, cas14b	*Uncultured archaeon*
		V-F3	cas1, cas2, cas4, cas14c,	*Candidatus Micrarchaeota archaeon*
		V-G	cas12g	Hot springs metagenome
		V-H	cas12h	*Hypersaline lake sediment metagenome* (JGI)
		V-I	cas12i	*Freshwater metagenome* (JGI)
		V-K(V-U5)	c2c5, tniQ, tnsC, tnsB,	*Cyanothece* sp. PCC8801
		V-U1	c2c4	*Gordonia otitidis*
		V-U2	c2c8	*Cyanothece* sp. PCC8801
		V-U4	c2c9	*Rothia dentocariosa* M567
	VI	VI-A	cas1, cas2, c2c2	*Leptotrichia shahii*
		VI-B1	c2c6, csx28	*Previotella buccae*
		VI-B2	csx27, c2c6	*Bergeyella zoohelcum*
		VI-C	c2c7,	*Fusobacterium perfoetens*
		VI-D	cas1, cas2, cas13d, WYL	*Ruminococcus bicirculans*

for the use of CRISPR typing in phylogenetic studies which are based on the evaluation of a number of evolutionary events resulting in sequence changes. For now, it is impossible to prove which mutagenic factor could be responsible for the loss of a cluster of neighboring spacers from CRISPR [24, 34]. Data sources

indicate that the multiplex nature of the CRISPR-Cas mechanism enables recognition of multiple loci simultaneously, which leads to large deletions, inversions, or translocations [35–37]. The system does not always require perfect complementarity to target DNA sequences, and therefore it is able to cause indel change outside the target sequence leading to random mutations [38]. In turn, the stability of CRISPR-Cas in the bacterial genome and its mechanism of regulation seems to be crucial factors in the process of adaptation to unfavorable environmental conditions.

4. Correlation with bacterial pathogenicity

Presumably, the CRISPR-Cas system acts not only as a defense against foreign genetic material, but also plays a role in the regulation of other bacterial genes expression [39, 40]. The polymorphism of CRISPR-Cas genes in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) is associated with the expression of *stx* (phage-encoded Shiga toxin) and *eae* (intimin virulence factor) virulence genes [41]. It is also confirmed that deletion of genes coding for transcription regulators affects the expression of *cas* genes. For example, removal of the *ompR* regulator in *Y. pestis* causes changes in expression of 244 genes, including repression of transcription of *cas1* [42, 43]. It is also very likely that *cas* genes are involved in the bacterial stress response. In *Enterococcus faecalis*, which causes opportunistic intestinal infections, a stress response is mediated by effector molecules, e.g. (p)ppGpp. The synthesis of these molecules is regulated by pyrophosphokinase GTP, which was correlated with the lower expression of *cas* genes in *E. faecalis*. This observation was described by Yan *et al.* (2009) after antibiotic therapy [44]. García-Gutiérrez *et al.* (2015) showed a dependency between the increased number of virulence factors and the reduced number of repeated sequences in *E. coli* CRISPR loci [45]. Moreover, it was shown that pathogenic *E. coli* strains isolated from distant ecological niches varied in terms of the number of CRISPR repeats. There is also evidence that the CRISPR-Cas regions correlate with higher drug resistance of *E. coli* [46]. It has also been noticed that the spacer sequence was complementary to plasmids harboring antibiotic resistance genes [80]. In another experiment, different biofilm production in various *E. faecalis* strains was observed. The strains that possessed CRISPR-Cas systems formed biofilm more intensively than bacteria without this system. A similar observation was made among *Pseudomonas aeruginosa* PA14, where *cas* genes affected biofilm production and the formation of swarming cells [47–49]. Thus, it can be assumed that modification of CRISPR-Cas genes may change the profiles of bacterial virulence. It is clear that the CRISPR-Cas system is associated with modulation of bacterial pathogenicity, including drug resistance, but lots of "white spots" still remain an issue of CRISPR-Cas biology. An interesting question arises whether particular types of the CRISPR-Cas systems correlate with the pathogenicity of bacteria or phages?

5. Potential tool for medicine

5.1. CRISPR-tool for genome editing

Recently, the CRISPR-Cas system has been considered a tool for genome editing. The ease of use of such systems is their main advantage. This is true because of the nature of sequence recognition, which differs significantly from conventional, nuclease-mediated DNA editing techniques. The advantage of the CRISPR-Cas results from the fact that DNA recognition comes not from protein but from the 20-bp guide RNA sequence [50]. Instead of preparation of individual DNA-recognition domains (via protein engineering), multiple site-specific guide RNA particles may be used. This is a significant boost in applicability in a variety of genome editing experiments. Jinek *et al.* (2012) [21] developed the crRNA (CRISPR RNA) mechanism to guide the silencing of invading nucleic acids. The specific two-RNA chimera directs specific Cas9 endonucleases to introduce double-stranded breaks in target DNA, e.g. the Cas9 HNH nuclease domain cleaves the complementary strand, whereas the Cas9 RuvC-like domain cleaves the noncomplementary strand. Their study highlights the potential to exploit the CRISPR-Cas system for RNA-programmable genome editing.

Generally, the challenge in CRISPR-Cas genome editing technologies is engineering highly specific and programmable nucleases that generate DNA double-strand breaks (DSBs) and supervision over the induced DNA repair pathways. One of them is the nonhomologous end-joining (NHEJ) repair pathway, which is an error-prone process and often causes random deletion or insertion [51]. It turned out to be a faster and highly efficient (up to 80%) process in comparison to traditional homologous recombination (HR), useful especially for the generation of knock-out mutants [52, 53]. The DSBs induced by CRISPR-Cas can be repaired also through the homology-directed-repair (HDR) pathway which is also more effective than the traditional HR technique and more precise than NHEJ. Gene editing using the CRISPR-Cas system with HDR recombination between genomic and homologous exogenous DNA is a tremendous opportunity for gene correction therapy, however, the simultaneous suppressing of NHEJ response, which generates harmful byproducts, remains a challenge for researchers [54].

Another unresolved disruption for the application of the CRISPR-Cas in genome editing is the risk of off-target cuts due to tolerance of gRNA to mismatched DNA [38, 55]. This is a serious problem for the application of this technology in gene therapy because of the poor knowledge about the consequences of off-target genome editing [56]. Here, bioinformatics specialists have a lot to do and intensive research is underway to develop appropriate bioinformatic tools to identify potential off-target sites or design the most specific gRNAs and other components of the CRISPR-tool [57]. Currently, there is intense research performed on Cas9 nuclease manipulation to increase the specificity of this technology. These modifications include, for example, temporary expression of the nuclease [58] and also the application of modified nSpCas9 (nCas9) protein with its own sgRNA, which cuts a single strand through the inactivation of the nuclease domain RuvC or HNH [59], or the mitigating of the helicase activity (eSpCas9) [60]. Another modification includes the fusing of the nuclease Fok1 with the dead SpCas9 (dSpCas9) which has inactivated HNH and RuvC domains [61], or (tested on mice models) the binary system Split-SpCas9 that uses the expression of the nuclease lobe and the α-helical domain independently, where modified gRNA abolishes the Cas9 activity and divides the dimer [62]. Scientists are also looking for alternative solutions in newly discovered nucleases (e.g. SaCas9, St1Cas9, or NmCas9) encoded by other *cas* genes, which could be easier packed into viral vectors due to their smaller size [59]. Brand-new enzymes like *Cpf*1 with shorter crRNA sequences or C2c2 (Cas13a) and C2c6 (Cas13b) cleaving RNA also aspire to be better substitutes of SpCas9 in CRISPR engineering [63, 64].

5.2. Instances of CRISPR-tool strategies in medicine

First genome-editing technologies (i.e. zinc finger proteins (ZFNs) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs)) are still useful but now the CRISPR-Cas9 system is more popular. In particular, genome-editing endonucleases have significantly improved our ability to make precise changes in the DNA of eukaryotic cells as well as therapeutic strategies against viral infections. The human immunodeficiency virus (HIV) remains a major global public health issue, with more than 35 million individuals being infected worldwide. In the HIV context, CRISPR-Cas9 applications might go further than current anti-retroviral therapy. In the case of HIV-1, the product of the CXCR4 gene in primary T cells mediates viral entry into human CD4+ cells by binding to envelope protein gp120. Modifications of CXCR4 may induce resistance to HIV-1. When evaluating the therapeutic strategy based on CRISPR-Cas9, it is critical to understand that not only can HIV be eliminated from latently infected cells, but the majority of uninfected cells will become resistant to HIV infection too. HIV gene therapy has progressed very slowly until recent breakthroughs in gene-editing methods using the CRISPR-Cas9 [65]. Recently, Dash *et al*. have demonstrated that CRISPR-Cas9, used in conjunction with the so-called LASER ART (Long Active, Slow-Effective Release Antiviral Therapy) successfully eliminated latent HIV-1 reservoirs from infected, humanized mice [66]. Although important challenges still need to be overcome, it seems that a promising pathway to HIV cure has been found. The CRISPR-Cas9 seems to be also a viable tool for eliminating other viruses that persist post-infection in host cells. Promising results have been shown for the hepatitis B virus (HBV). Sakuma *et al.* used a multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vector system, simultaneously targeting three domains in the HBV genome. One of the goals achieved was the elimination of HBV DNA from host cells via fragmentation. This fact seems crucial because the presence of stable cccHBV DNA in the liver cells is a major obstacle in suppressing HBV infection [67]. The use of CRISPR-Cas9 based strategies has shown promising results against high-risk human papillomavirus (HPV) infection which is directly associated with an increased risk of developing cancer in an infected individual. Two studies show that CRISPR-Cas9 could be useful in HPV-related cancer therapy. This system can cause virus degradation and cell line growth inhibition (cervical cancer and anal cancer) [68, 69]. Results showing the antiviral potency of the CRISPR-Cas9 strategy have also been obtained in studies of viruses like the hepatitis C virus (HCV) [68], the Epstein-Barr virus (EBV) [69], and the African swine fever virus (ASFV) [70]; the latter happens to be a major epidemiological, as well as economical issue in Europe nowadays.

The CRISPR-Cas application is important for the possible use in gene therapy for monogenic recessive disorders due to loss-of-function mutations such as in the case of cystic fibrosis (CF) and Duchenne muscular dystrophy (DMD). These studies underscored the huge potential of the CRISPR-Cas technology for human gene therapy. CF is an inherited disease related to a defect in the gene coding for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). It was found that in 70% of CF cases, the deletion of phenylalanine at the 508th position on the protein chain had taken place. Using cultured primary adult intestinal stem cells derived from cystic fibrosis patients, the CFTR locus responsible for cystic fibrosis was corrected by homologous recombination (HR) with available homologous donor templates. This resulted in the clonal expansion of organoid cultures (miniature organ-like cell clusters) harboring exact

genetic change. The authors proved that the corrected allele is expressed and fully functional as measured in clonally expanded organoids [71]. DMD is a recessive X-linked disorder caused by a defective gene coding for dystrophin, which afflicts primarily males and affects both skeletal and cardiac muscles. In the context of gene therapy of DMD, there are a few ongoing studies on the *mdx* mouse model of DMD with a nonsense mutation in exon 23, which prematurely terminates protein production [72, 73]. They have shown that the Cas9 nuclease is targeted to introns 22 and 23 by two single guide RNAs. Generation of double stranded breaks (DSBs) by nuclease leads to cutting of the region surrounding the mutated exon 23. The distal ends are repaired through the non-homologous end joining system (NHEJ). Consequently, the reading frame of the dystrophin gene is recovered and protein expression is restored. It was established that CRISPR-treated mice showed no phenotypic evidence of toxicity [73, 74]. Zhang *et al.* (2020) applied the CRISPR-Cas9 technology to correct diverse genetic mutations in animal models of DMD, but the high doses of adeno-associated virus (AAV) were a significant problem in further clinical application. Their recent study on the DMD mouse model demonstrated a 20-fold higher efficiency of this technology by packing Cas9 nuclease in single-stranded AAV (ssAAV) and use of CRISPR single guide RNAs in self-complementary AAV (scAAV). The authors observed a restoration of dystrophin expression and improved muscle contractility in mice [75]. It was shown that the CRISPR-Cas system type II can directly correct a genetic defect through NHEJ or HR mediated gene editing. This provides a proof of concept for a gene correction by homologous recombination in stem cells cultured from patients with a single-gene hereditary defect.

Standard antimicrobial strategies, such as the use of antibiotics, have a non-specific effect, removing sensitive microorganisms, both pathogenic and commensals. The development of new antibiotics and antimicrobial peptides requires detailed knowledge of the metabolism and physiology of bacteria. Lytic bacteriophages, in turn, offer exquisite specificity, but individual bacteriophages must be isolated against a specific strain, and this requires additional screening to determine the degree of specificity [76]. There is evidence that CRISPR-Cas systems could be used as a "smart antibiotic" acting specifically against particular pathogenic bacteria and saving natural microbiota [23, 77]. In *Escherichia coli* with expression of the type I-E or II-A system, transformation of a plasmid with spacers targeting endogenous genes or a lysogenized bacteriophage has led to extremely low recovery of viable transformants [78–82]. The method still requires further optimization, but offers many possibilities to fight multidrug resistant bacteria.

6. Phage response

A response to the CRISPR-Cas system was observed for the first time among phages closely related to the group of Mu-like phages. Nine anti-CRISPR genes in the phage genome were characterized [83, 84]. The CRISPR-Cas system can be blocked at the stage of complex formation and recognition of foreign DNA. In infected *P. aeruginosa*, the phage genome contains genes *acrF2*, *acrF1,* and *acrF3* which encode anti-CRISPR proteins [84, 85]. Production of anti-CRISPR proteins is an excellent example of an "arms race" between phages and bacteria, where phages are constantly evolving to overcome bacterial defense systems. Anti-CRISPR proteins could be used in phage therapy of pathogenic strains that express resistance induced by the CRISPR-Cas system. It is extremely relevant in the case of infections where phage therapy is the sole solution [85].

The bacterial CRISPR-Cas system targets and degrades foreign DNA from all mobile genetic elements, including plasmids, transposons, and pathogenicity islands [9, 86]. Similar to phages, successful transfer of other mobile genetic elements will depend on the inactivation of the CRISPR-Cas systems of particular bacteria. In *Pseudomonas* sp., the anti-CRISPR protein sequences are found in genome loci that are not associated with the CRISPR-Cas region. Such regions include several elements that are involved in DNA transfer and conjugation [83]. Interestingly, also the anti-CRISPR genes in mobile genetic elements may play an important role in increasing the virulence of bacterial strains. For example, an anti-CRISPR homolog was discovered in an active pathogenicity island of a highly virulent *P. aeruginosa* clinical isolate [87].

The first step of the CRISPR-Cas system operation is the adaptation of foreign DNA (spacer) by its insertion into the end of the leader CRISPR sequence and duplication of the CRISPR repeat [3, 88]. Considering occurrences like cutting, insertion, and duplication of DNA fragments, it is highly probable that other mechanisms of DNA metabolism are involved in this system. Ivančić-Bace *et al.* (2015) proved that replication proteins and DNA repair proteins, i.e. DNA polymerase I, RecG, and PriA, were required to insert new spacers in CRISPR loci [89]. It is not excluded that more proteins specific to other important cellular processes can be involved in this system.

7. Conclusions

The CRISPR-Cas system is associated with multiple functions in bacterial cells, starting from the original function of resistance to foreign DNA and ending with the regulation of biofilm production. It is also likely

that some of the spacer sequences are complementary to short sequences in the bacterial genome, which may have an influence on the regulation of bacterial genes, e.g. virulence factors. As a result of the "arms race", phages synthesize anti-CRISPR genes, which could be extremely relevant in multi-drug resistant (MDR) bacteria therapy. In the last decades, a significant increase in the number of MDR strains has been observed, not only in hospitals but also in the environment. In Europe, the mortality rate caused by such infections is as high as 25 000 deaths per year. According to predictions, this number will probably increase in the following years. Phage therapy could be an alternative strategy against MDR bacteria which can also be equipped with the CRISPR-Cas system. Initially, it was proposed that the CRISPR-Cas system may be used in genetic modification of organisms and, in the future, in gene therapy. A wide range of applications for the CRISPR-Cas array opens many possibilities for contemporary medicine, biotechnology, industry, and environmental protection. However, it is still necessary to know all the shades of this phenomenon.

Funding: This work was supported under the program of the Minister of Science and Higher Education under the name "Regional Initiative of Excellence in 2019–2022 project number: 024/RID/2018/19, financing amount: 11.999.000,00 PLN. This work was also co-financed by miniGrant UJK number: SMGR.RN.20.181.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: For this type of study formal consent is not required. This article does not contain any studies with human participants or animals carried out by any of the authors.

Informed consent: For this type of study formal consent is not required.

References

1. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C.: The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. **8**, 172 DOI:10.1186/1471-2105-8-172 (2007)
2. Beloglazova N., Yakunin A.F., *et al*.: A novel family of sequence--specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biol Chem*. **283**, 20361–20371 (2008)
3. Horvath P., Romero D.A., Coute-Monvoisin A.-C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R.: Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. **190**, 1401–1412 (2008)
4. Jansen R., Embden J.D.A. van, Gaastra W., Schouls L.M.: Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. **43**, 1565–1575 (2002)
5. Makarova K.S., Koonin E.V., *et al*.: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. **9**, 467–477 (2011)
6. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007)
7. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakatura A.: Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. **169**, 5429–5433 (1987)
8. Kamerbeek J., van Embden J., *et al*.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. **35**, 907–914 (1997)
9. Mojica F.J.M., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G.: Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol*. **36**, 244–246 (2000)
10. Comas I., Homolka S., Niemann S., Gagneux S.: Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One*. **4**, e7815 (2009)
11. Makarova K.S., Grishin N. V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V.A.: putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. **16**, 1–7 (2006)
12. Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E.A.: Guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*. **1**, e60 (2005)
13. Makarova K.S., Koonin E.V., *et al*.: Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. **18**, 67–83 (2019)
14. Godde J.S., Bickerton A.: The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol*. **62**, 718–729 (2006)
15. Kunin V., Sorek R., Hugenholtz P.: Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*. **8**, R61 (2007)
16. Bolotin A., Hols P., *et al*.: Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol*. **22**, 1554–1558 (2004)
17. Shmakov S., Koonin E.V., *et al*.: Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*. **60**, 385–397 (2015)
18. Mir A., Edraki A., Lee J., Sontheimer E.J.: Type II-C CRISPR--Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS Chem Biol*. **13**, 357–365 (2018)
19. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O.: Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. **156**, 935–949 (2014)
20. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E.: CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, **471**, 602–607 (2011)
21. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.A.: Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816–821 (2012)
22. Louwen R., Staals R.H.J., Endtz H.P., van Baarlen P., van der Oost J.: The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 74–88 (2014)
23. Gomaa A., Klumpe H.E., Luo M.L., Selle K., Barrangou R., Beisel C.L.: Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio*. **5**, e00928–13 (2014)

24. Semenova E., Jore M.M., Datsenko K.A., Semenova A., Westra E.R., Wanner B., van der Oost J., Brouns S.J., Severinov K.: Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *PNAS*. **108**, 10098–10103 (2011)
25. Makarova K.S., Koonin E.V., *et al*.: An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. **13**, 722–736 (2015)
26. Abadia E., Sola C., *et al*.: Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infect Genet Evol*. **10**, 1066–1074 (2010)
27. Gomgnimbou M.K., Abadia E., Zhang J., Refregier G., Panaiotov S., Bachiyska E., Sola C.: "Spoligoriftyping," a dual-priming--oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multianalyte microbead-based hybridization system. *J Clin Microbiol*. **50**, 3172–3179 (2012)
28. Huang Q., Luo H., Liu M., Zeng J., Abdalla A.E., Duan X., Li Q, Xie J.: The effect of *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-associated Cas2 (Rv2816c) on stress response genes expression, morphology and macrophage survival of *Mycobacterium smegmatis*. *Infect Genet Evol*. **40**, 295–301 (2016)
29. Schouls L.M., Reulen S., Duim B., Wagenaar J.A., Willems R.J.L., Dingle K.E., Colles F.M., Van Embden J.D.: Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J Clin Microbiol*. **41**, 15–26 (2003)
30. Mokrousov I., Limeschenko E., Vyazovaya A., Narvskaya O.: *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. *Biotechnol J*. **2**, 901–906 (2007)
31. Ginevra C., Jarraud S., *et al*.: *Legionella pneumophila* sequence type 1/Paris pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol*. **50**, 696–701 (2012)
32. Dang T.N.D., Zhang L., Zöllner S., Srinivasan U., Abbas K., Marrs C.F., Foxman B.: Uropathogenic *Escherichia coli* are less likely than paired fecal *E. coli* to have CRISPR loci. *Infect Genet Evol*. **19**, 212–218 (2013)
33. Calleros L., Betancor L., Iraola G., Méndez A., Morsella C., Paolicchi F., Silveyra S., Velilla A., Pérez R.: Assessing the intra--species genetic variability in the clonal pathogen *Campylobacter fetus*: CRISPRs are highly polymorphic DNA markers. *J Microbiol Methods*. **132**, 86–94 (2017)
34. Price E.P., Smith H., Huygens F., Giffard P.M.: High-Resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Appl Env Microb*. **73**, 3431–3436 (2007)
35. Blasco R.B., Karaca E., Ambrogio C., Cheong T.C., Karayol E., Minero V.G., Voena C., Chiarle R.: Simple and rapid *in vivo* generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep*. **9**, 1219–1227 (2014)
36. Essletzbichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M., Bürckstümmer T.: Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*. **24**, 2059–2065 (2014)
37. Liu H., Wei Z., Dominguez A., Li Y., Wang X., Qi L.S.: CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*, **31**, 3676–3678 (2015)
38. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D.: High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. **31**, 822–826 (2013)
39. Marraffin L.A., Sontheimer E.J.: Self vs. non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*. **463**, 568–571 (2010)
40. Stern A., Keren L., Wurtzel O., Amitai G., Sorek R.: Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends Genet*. **26**, 335–340 (2010)
41. Delannoy S., Beutin L., Burgos Y., Fach P.: Specific detection of enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 strains by use of the CRISPR locus as a target for a diagnostic real-time PCR. *J Clin Microbiol*. **50**, 3485–3492 (2012)
42. Sebbane F., Lemaitre N., Sturdevant D.E., Rebeil R., Virtaneva K., Porcella S.F., Hinnebusch B.J.: Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague. *PNAS*. **103**, 11766–11771 (2006)
43. Gao H., Zhang Y., Han Y., Yang L., Liu X., Guo Z., Tan Y., Huang X., Zhou D., Yang R.: Phenotypic and transcriptional analysis of the osmotic regulator OmpR in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*. **11**, 39 (2011)
44. Yan X., Zhao C., Budin-Verneuil A., Hartke A., Rince A., Gilmore M.S., Auffray Y., Pichereau V.: The (p)ppGpp synthetase RelA contributes to stress adaptation and virulence in *Enterococcus faecalis* V583. *Microbiology*, **155**, 3226–3237 (2009)
45. García-Gutiérrez E., Almendros C., Mojica F.J.M., Guzmán N.M., García-Martínez J.: CRISPR content correlates with the pathogenic potential of *Escherichia coli*. *PLoS One*, **10**, e0131935 (2015)
46. Touchon M., Charpentier S., Pognard D., Picard B., Arlet G., Rocha E.P.C., Denamur E., Branger C.: Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements. *Microbiology*, **158**, 2997–3004 (2012)
47. Zegans M.E., Wagner J.C., Cady K.C., Murphy D.M., Hammond J.H., O'Toole G.A. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. **191**, 210–219 (2009)
48. Palmer K.L., Gilmore M.S.: Multidrug-eesistant enterococci lack CRISPR-Cas. *MBio*. **1**, 1–2 (2010)
49. Palmer K.L., Whiteley M.: DMS3-42: the secret to CRISPR--dependent biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. **193**, 3431–3432 (2011)
50. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V.: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *PNAS*. **109**, E2579–2586 (2012)
51. Klein H.L., Malkova A., *et al*.: Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways. *Microb Cell*. **6**, 1–64 (2019)
52. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch.: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **153**, 910–918 (2013)
53. Ding Q., Regan S.N., Xia Y., Oostrom L.A., Cowan C.A., Musunuru K.: Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*. **12**, 393–394 (2013)
54. Kato-Inui T., Takahashi G., Hsu S., Miyaoka Y.: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR--associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. *Nucleic Acids Res*. **46**, 4677–4688 (2018)
55. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R.: High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. **31**, 839–843 (2013)
56. Cornu T.I., Mussolino C., Cathomen T.: Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat Med*. **23**, 415–423 (2017)

57. Kaur K., Gupta A.K., Rajput A., Kumar M.: ge-CRISPR – An integrated pipeline for the prediction and analysis of sgRNAs genome editing efficiency for CRISPR/Cas system. *Sci Rep-UK*. **6**, 30870 (2016)
58. Cao J., Wu L., Zhang S.-M., Lu M., Cheung W.K.C., Cai W., Gale M., Xu Q., Yan Q.: An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting. *Nucleic Acids Res*. **44**, e149 (2016)
59. Murovec J., Pirc Ž., Yang B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. *Plant Biotechnol J*. **15**, 917–926 (2017)
60. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F.: Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, **351**, 84–88 (2016)
61. Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung JK.: Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*. **32**, 569–576 (2014)
62. Wright A.V., Sternberg S.H., Taylor D.W., Staahl B.T., Bardales J.A., Kornfeld J.E., Doudna J.A.: Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *PNAS*. **112**, 2984–2989 (2015)
63. Zetsche B., Zhang F., *et al*.: Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, **163**, 759–771 (2015)
64. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F.: RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, **358**, 1019–1027 (2017)
65. Liu Z., Guo D., *et al*.: Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci*. **7**, 47 (2017)
66. Dash P.K., Gendelman H.E., *et al*.: Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected humanized mice. *Nat Commun*. **10**, 2753 (2019)
67. Sakuma T., Masaki K., Abe-Chayama H., Mochida K., Yamamoto T., Chayama K.: Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*, **21**, 1253–1262 (2016)
68. Yu L., Wang H., *et al*.: Deletion of HPV18 E6 and E7 genes using dual sgRNA-directed CRISPR/Cas9 inhibits growth of cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Med*. **10**, 9206–9013 (2017)
69. Hsu D.S., Kornepati A.V.R., Glover W., Kennedy E.M., Cullen B.R.: Targeting HPV16 DNA using CRISPR/Cas inhibits anal cancer growth *in vivo*. *Futur Virol*. **13**, 475–482 (2018)
70. Hübner A., Petersen B., Keil G.M., Niemann H., Mettenleiter T.C., Fuchs W.: Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Sci Rep-UK*. **8**, 1449 (2018)
71. Schwank G., Clevers H., *et al*.: Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. **13**, 653–658 (2013)
72. Bushby K., Constantin C., *et al*.: Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. **9**, 77–93 (2010)
73. Nelson C.E., Gersbach C.A., *et al*.: *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, **351**, 403–407 (2016)
74. Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R.: Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. *Cell Res*. **26**, 513–514 (2016)
75. Zhang Y., Olson E.N., *et al*.: Enhanced CRISPR-Cas9 correction of Duchenne muscular dystrophy in mice by a self-complementary AAV delivery system. *Sci Adv*. **6**, e6812 (2020)
76. Verbeken G., Pirnay J.P., Lavigne R., Ceulemans C., De Vos D., Huys I.: Viruses that can cure, when antibiotics fail... *J Microb Biochem Technol*. **8**, 21–24 (2016)
77. Sapranauskas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V.: The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. **39**, 9275–9282 (2011)
78. Bikard D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L.A.: Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*. **41**, 7429–7437 (2013)
79. Edgar R., Qimron U. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J Bacteriol*. **192**, 6291–6294 (2010)
80. Yosef I., Goren M.G., Kiro R., Edgar R., Qimron U.: High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *PNAS*. **108**, 20136–20141 (2011)
81. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A.: RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. **31**, 233–239 (2013)
82. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A.: Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152**, 1173–1183 (2013)
83. Pawluk A., Bondy-Denomy J., Cheung V.H.W., Maxwell K.L., Davidson A.R.: A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*. **5**, 1–7 (2014)
84. Bondy-Denomy J., Pawluk A., Maxwell K.L., Davidson A.R.: Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, **493**, 429–432 (2013)
85. Maxwell K.L.: Phages fight back: inactivation of the CRISPR-Cas bacterial immune system by anti-CRISPR proteins. *PLOS Pathog*. **12**, e1005282 (2016)
86. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G.: CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, **151**, 653–663 (2005)
87. Battle S.E., Meyer F., Rello J., Kung V.L., Hauser A.R.: Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J Bacteriol*. **190** 7130–7140 (2008)
88. Tyson G.W., Banfield J.F.: Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Env Microbiol*. **10**, 200–207 (2008)
89. Ivančić-Baće I., Cass S.D., Wearne S.J., Bolt E.L.: Different genome stability proteins underpin primed and naïve adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity. *Nucleic Acids Res*. **43**, 10821–10830 (2015)
90. Nishimasu H., Nureki O.: Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Curr Opin Struc Biol*. **43**, 68–78 (2017)
91. Amitai G., Sorek R.: CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol*. **14**, 67–76 (2016)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 13–20
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.02

NOVEL SARS-COV-2 PANDEMIC TRANSMISSION WITH ONGOING ANTIVIRAL THERAPIES AND VACCINE DESIGN

Muhammad Yameen[1], Sara Sattar[3], Ayesha Khalid[3], Muhammad Aamir Aslam[2], Nishat Zafar[2]*, Muhammad Hassan Saeed[4], Muhammad Haseeb Arif[4], Muhammad Jahangeer[1], Azka Qadeer[2], Shoukat Hussain[1], Muhammad Aamir[2], Sania Mukhtar[2], Huma Nasir[2], Asif Shahzad[1]

[1] Department of Biochemistry, Government College University, Faisalabad (38000) – Pakistan
[2] Institute of Microbiology, University of Agriculture Faisalabad (38000) – Pakistan
[3] Department of Biosciences, COMSATS University Islamabad Pakistan
[4] Department of Microbiology & Molecular Genetics, University of Punjab, Lahore Pakistan

Received in July, accepted in October 2020

Abstract: Starting from the end of 2019 the new SARs-CoV-2 virus, in the period of a few months, had spread to 210 countries and its territories. The Wuhan wild animal market, in Hubei province, China is considered the epicenter of this pandemic. WHO declared the name COVID-19 to designate the disease caused by the SARS-CoV-2 virus. It is the third coronavirus pandemic after SARS in 2002–2003 and MERS-CoV in 2012. Genome sequencing of this new COVID-19/SARS-CoV-2 virus shows slight genetic diversity when compared to other coronaviruses. Owing to its pathogenesis, and less known replication cycle, no universal antiviral treatment can be applied and vaccine preparation is still a larger challenge. The present article will highlight transmission, pandemic status, genetic diversity current antiviral therapy, and vaccine trials for COVID-19.

1. Introduction. 2. Pathogenesis of coronaviruses. 3. Genetic diversity. 4. Transmission. 5. Vaccination strategies against COVID-19. 6. In Process Vaccination strategies against COVID-19. 7. Lack of antiviral treatment and antiviral treatment studies. 8. Precautions. 9. Conclusions

Keywords: SARs-CoV-2, WHO, viral genome, COVID-19

1. Introduction

Coronaviruses (CoVs) are a group of viruses named after their crown-shaped spike proteins. Coronaviruses are known for infecting a broad range of classes in the Animalia kingdom, including humans, mice, snakes, and other vertebrates [37]. Till the mid-1960s only six human coronaviruses were known HCoV-229E, HCoV--OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1s, severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS--CoV) [29, 30]. These six HCoVs can be divided into two groups based on the severity of the infection they cause. Group A includes HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, and HCoV-HKU1 usually causes a less virulent disease, in one study HCoV-229E and HCoV--OC43 accounted for 15–29% of the respiratory pathogen with low virulence for humans [29, 30].

Group B includes SARS-CoV and MERS-CoV. These two have different pathogenicity but have a high fatality rate when compared to other members of coronaviruses. MERS-CoV caused renal failure and acute pneumonia in its first patient from Saudi Arabia in 2012. That virus infected 2494 people with 858 deaths reported from 27 countries with a case fatality rate (CFR) of 34.4%. SARS-CoV caused respiratory failure in patients firstly recognized and reported from China and infected 8422 people with 919 deaths from 32 countries between November 2012 and August 2013 with CFR of 11% [41].

Emerging at the end of 2019 in Wuhan, China, SARS-CoV-2 was initially recognized as a pneumonia--causing unknown agent related to coronavirus, after which it was declared as a Public Health Emergency by WHO on 30 January 2020. On 11 February 2020 WHO officially declared the name "COVID-19" for this novel coronavirus disease [13]. It has become an international calamity affecting over 32.1 million people worldwide with over 980,000 deaths overall and these numbers are still increasing day by day [38]. The countries severely affected by COVID-19 included the USA, India, Brazil, Russia, France, Italy, China, Spain, Germany, and in short the rest of the world, however, the highest deaths

* Corresponding author: Nishat Zafar, Institute of Microbiology, University of Agriculture Faisalabad (38000) – Pakistan; e-mail: nishat_zafar@yahoo.com

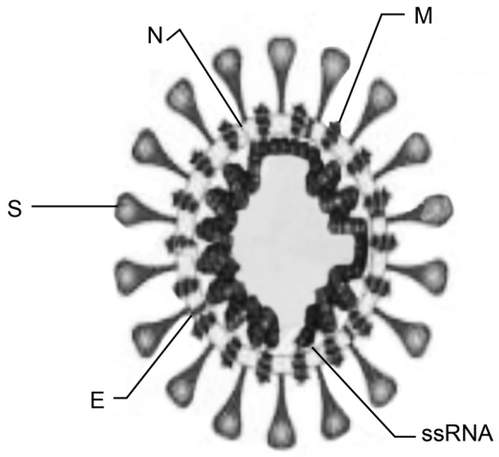


Fig. 1. The structure of SARS-CoV-2. ssRNA genome (26–32 kb) in the center, four structural proteins: spike glycoprotein (S), envelope protein (E), matrix protein (M), and nucleocapsid protein (N). Apart from these, many accessory proteins are also present but not shown in the figure [22].

are being reported from the USA, India, Italy, France, Spain, and UK [39]. The new variant SARS-CoV-2 causes severe acute respiratory syndrome and leads to death [26]. On 22 April, CFR worldwide of COVID-19 is calculated to be 6.89% [39] compared to on March 3 was 3.4% [38]. However, if we take account of mortality rate between different countries for example, in Italy the virus has a mortality rate of 7.2% vs 2.1% in China. According to current information, the suggested source of SARS-CoV-2 is likely bats (it is normally host to many CoVs), but there is no absolute evidence on its origin [2].

Coronaviruses have been known for years since the 1960s but how long they had existed is not known. Commonly they cause mild disease, but some highly pathogenic strains do occur that are noted by being given a distinct name after causing an outbreak. COVID-19 is the current pandemic the whole world is fighting. The pathogenesis of this novel virus is still unclear. In this article, we aim to discuss the transmission, pandemic, genetic diversity, and antiviral treatments, and precautionary measures against COVID-19.

2. Pathogenesis of coronaviruses

CoVs enters a human body when coming in contact with a source animal, or infected human body fluids via sneezing droplets, coughing, sharing food, touching virus soiled inanimate objects, etc. In the case of SARS-CoV2, the virus will bind to Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in the lower respiratory tract of an infected individual using its spike (S) proteins [9, 10]. For SARS-CoV, only single stranded (ss) positive sense RNA genome is released inside the cytoplasm of a cell through fusion between a host cell's membrane and the virus [28]. But the same entry mechanism used by SARS-CoV-2 still needs to be confirmed. Once inside the cell ss+RNA act as mRNA and the host ribosome initiates translation of viral proteins: two polyproteins and structural protein (NS and S) which help in viral genomic replication and capsid formation [23]. Newly formed envelope glycoprotein migrate to the Golgi apparatus or Endoplasmic reticulum (not shown in figure 2), after which packaging of viral RNA inside a capsid occurs [9]. Once the virion particles are mature they are released through lysis or exocytosis from the cell. Due to lack of knowledge about this new virus and lack of detailed insight about which proteins are involved in causing host cell disruption and overcoming the host immune system, no particular treatment is present for it.

3. Genetic diversity

SARS-CoV-2 was previously shown to be a close relative of SARS-CoV and their Receptor binding domain of S-proteins also resemble each other [15]. The known differences in proteins encoded by both viruses are presented in table I. The phylogenetic trees' comparison has shown that SARS-CoV-2 is most closely related to the SARS-like bat viruses than human SARS-CoV [19]. Whole genome sequences of SARS-CoV-2 and coronavirus of bats has shown 96% similarities [40].

Table I
The differences found in proteins of SARS-CoV and SARS-CoV-2

Protein	SARS-CoV	SARS-CoV-2
8a	Present	Absent
8b	84 amino acids	121 amino acids
3b	154 amino acids	22 amino acids

The coronaviruses are the largest RNA viruses, with a genome size range of 26–32 kb [8]. A variable number of ORF (open reading frames), in the range of 6 to 11, exists in the genome of the coronavirus. ORF's are shown in figure 3. The 1st ORF, which is 67% of the whole genome, encodes 16 non-structural proteins. Genes for eight accessory proteins and four structural proteins are encoded at the 3' terminus of RNA, while genes encoding orf1a and orf1b proteins (comprise non-structural proteins) are located at the 5' terminus [15, 40]. There are five structural genes E, N, M, SM, and S, which encode envelope, nucleocapsid, membrane glycoprotein, small membrane protein, and spike protein, respectively [32]. N-proteins of SARS-CoV and SARS-CoV-2 have a 90% similarity in sequences.

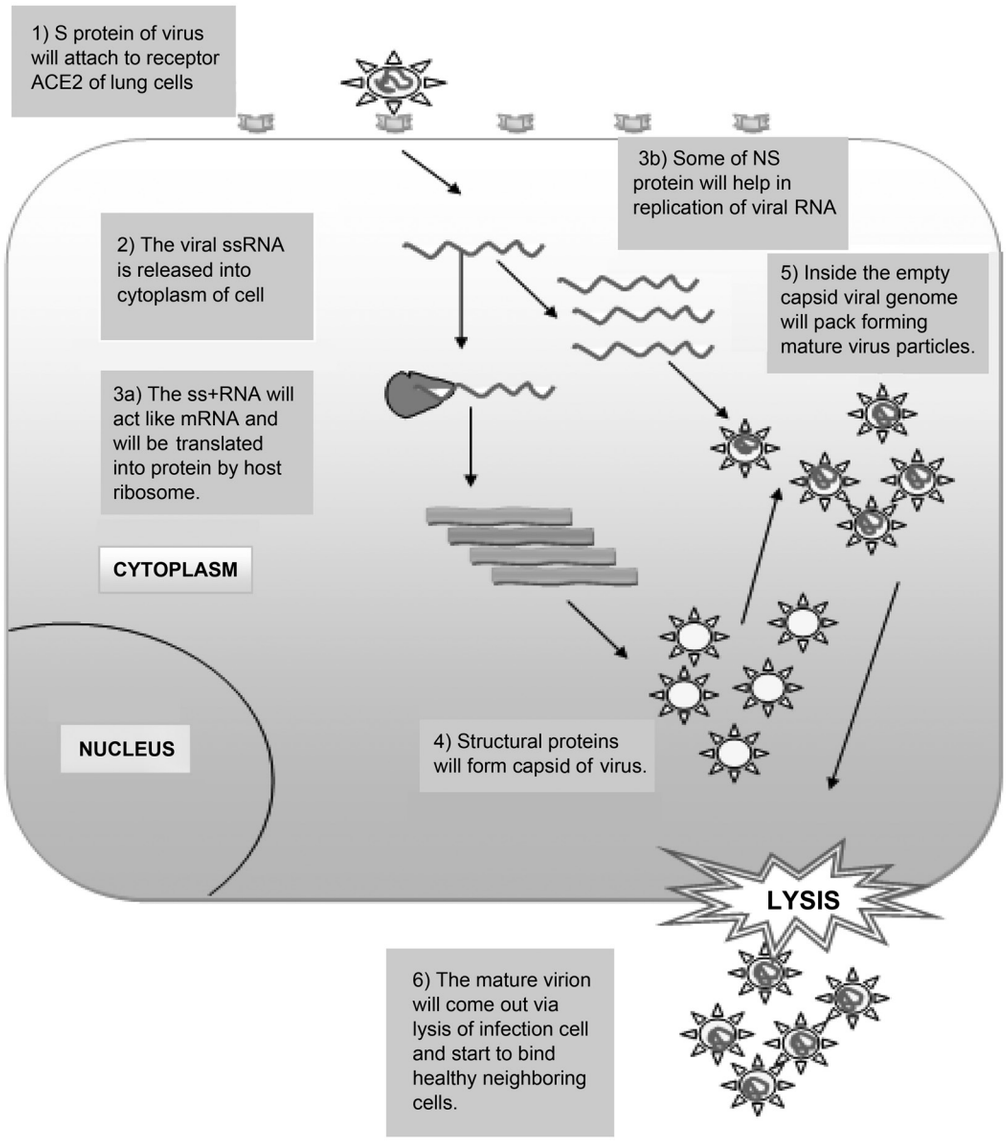


Fig. 2. General mode of replication of SARS-CoV. Starting with the attachment of viral S protein, present on the envelope, with ACE-2 receptor on lung cells the viral RNA is released inside the cytoplasm through membrane fusion. Once inside the cell +ssRNA act as mRNA and the host ribosome will start making viral proteins (2 polyproteins and structural protein) which help viral genomic replication and capsid formation, after which packaging of viral RNA inside a capsid occurs. Once the virion particles are mature they are released through lysis or exocytosis.

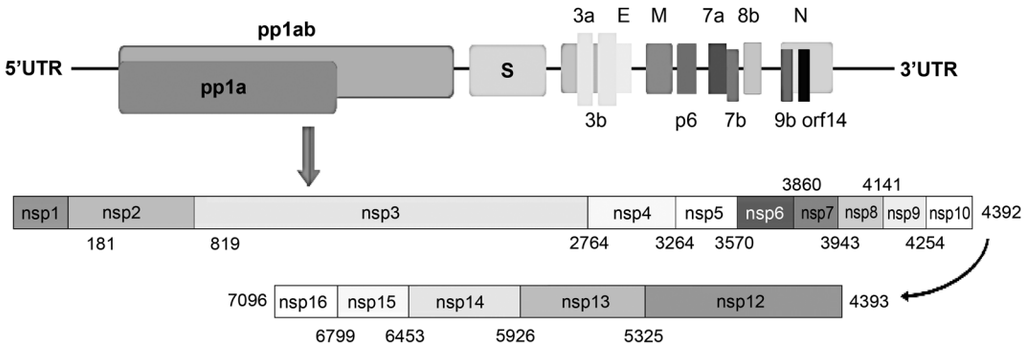


Fig. 3. ORF's of the genome of HB01 strain of SARS-CoV-2 (previously called 2019-nCoV) are shown. Structural proteins are encoded at the 3' terminus and non-structural at the 5' terminus (Modified from [40]).

Table II
The functions of non-structural proteins in the replication of coronaviruses are shown (Modified from [8])

Nsps	Functions
Nsp1	Degrade Cellular mRNA and constrain signaling of IFN
Nsp3	Blocking of host innate immune response and cut polypeptides
Nsp4	Development of double membrane vesicles
Nsp5	Constrain IFN signaling and cleave polypeptides
Nsp6	Restrict expansion of auto phagosomes
Nsp7	Nsp8 and Nsp12 co-factor
Nsp8	Nsp7 and Nsp12 co-factor
Nsp9	Interact with RNA binding and dimerization
Nsp10	Nsp14 and Nsp16 support protein
Nsp12	Primer, which function depends upon Rd-Rp
Nsp13	5 prime triphosphatase and RNA helicase
Nsp14	Exo ribonuclease activity
Nsp15	Exo ribonuclease activity
Nsp16	Regulate immune responses negatively and 2'-O-MTase

The N-protein of SARS-CoV acts as a viral suppressor protein of RNAi, to overcome the host immunity. The N-protein of SARS-CoV-2 can also have the same effect [15, 34]. The functions of non-structural proteins (Nsp) of coronaviruses are mentioned in table 2, except Nsp 2 and 11, whose functions are currently unknown.

4. Transmission

The natural host reservoir for SARS-like coronaviruses are reported to be bats, the intermediate host for the viruses are reported to be civets or camels and then they are transmitted to humans hence these viruses are capable of a host-species jump [16]. One of the major transmission routes of SARS-CoV-2 is human-to-human transmission within close contact and has caused an exponential increase in the number of cases. Aerosol transmission happens when an infected person coughs or sneezes shedding the virus in the air and touching inanimate objects infected with the virus are possible transmission routes [14, 17].

The current epidemic started when the earliest patients who went to Huanan seafood market in Wuhan city, Hubei province, China got infected with SARS-CoV-2 after coming in contact with some animals; the intermediate animal source is yet to be confirmed. These infected patients became a source of infection for other healthy people [20]. Reportedly a large number of infected people did not have exposure to the seafood market so it is likely they got infected from the earliest patients hence person-to-person contact became a major reason for the spread of this epidemic [5]. The reason why coronavirus caused havoc throughout the world and became a cause of lockdown in multiple countries is its high transmission rate [3].

One recently published study indicated a whole family of 6 was infected with this novel coronavirus although none of the family members visited the Wuhan seafood market, only 2 persons of the family visited Wuhan hospital where they might have caught the virus from infected patients. From the two infected family members the whole family got infected. Real time RT-PCR was used to test the RNA extracted from patient samples with new coronavirus virus specific primers and probes [17]. The patients had symptoms such as fever, upper or lower respiratory tract infections however, older patients (> 60 years) showed more systemic symptoms [5].

A recent report suggested that the virus can also take an ocular route of transmission [18]. Vertical

Table III
Different Vaccine Strategies with their Advantages and Disadvantages

Vaccine strategy	Advantages	Disadvantages	References
mRNA vaccines	Easy preparation, High Adaptability, Can induce strong immune responses	High unstable under physiological conditions	[24]
DNA vaccines	Easy preparation Neutralizing antibodies with high titer	Low immune responses May induce toxicity with repeated doses	[24]
Viral vector vaccines	Induces high humoral and cellular immune responses	Pre-existing immunity will be a problem	[11]
Subunit vaccines	Neutralizing antibodies with high titer, Induces high humoral and cellular immune responses	High cost Low immunity, Repeated doses may require	[11]
Attenuated virus vaccines	Quick development, High immune responses	Genotypic & phenotypic reversion possible	[25]
Inactivated virus vaccines	Easy preparation, Neutralizing antibodies with high titer	Not applicable for immunosuppressed individuals	[25]

Table IV
In process-Vaccines with its Candidates & Phase Trials

Manufacturer	Vaccine candidate	Phase trials [31]	References
Moderna	DNA-based vaccines which code or a stabilized form of of SARS-CoV-2 spike protein	Phase 3 starts in the 1st week of July. It will include the study of 30,000 patients	[4]
Curevac	Lab-made RNA to spur the production of corona proteins	Begins the human trials	https://www.curevac.com/en/covid-19/
Inovio	DNA-based vaccines	Human trials to start in later June	https://www.inovio.com/our-focus-serving-patients/covid-19/
Takis Biotech	DNA-based vaccines	Results of dose-response trials to be published in June	[27]
Zydus Cadila	DNA-based vaccines	Project is in pre-clinical trials	https://zyduscadila.com/
Stemirna Therapeutics	mRNA-based vaccines	Clinical trials expected to start in Mid-April	http://www.stemirna.com/en/index.aspx
Imperial College London	DNA-based vaccines	Human trial started	https://www.imperial.ac.uk/covid-19-vaccine-trial/
Novavax	Recombinant-protein nanoparticles derived from spike proteins of SARS-CoV-2	Phase I/II started in May 2020	https://www.novavax.com/covid-19-coronavirus-vaccine-candidate-updates
Vaxart	Oral vaccine half of 2020	Phase I begins in the second	https://vaxart.com/
GlaxoSmithKline (GSK)	A protein-based vaccine with the use of adjuvant	Animal trials	https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/gsk-and-curevac-to-develop-next-generation-mrna-covid-19-vaccines/
University of Saskatchewan	A protein-based candidate	Animal trials	https://www.vido.org/covid19/covid-19-news/
Sanofi	Recombinant DNA platform swapping the part of corona-virus with genetic material from a harmless virus	Phase 1 to be started in the last quarter of 2020	https://www.sanofi.com/en/about-us/our-stories/sanofi-s-response-in-the-fight-against-covid-19
Geovax Labs/ Bravovax	Develop a live horsepox virus which will be modified to express protein fragments from SARS-CoV-2	Pre-clinical stage	https://www.geovax.com/news/geovax-progresses-in-coronavirus-covid-19-vaccine-development-program
Cansino Biologics	Viral vector-based vaccine	Phase II – All volunteers developed neutralizing antibodies	[42]
Greffex	DNA-based vaccines: Adenovirus based vector vaccines that involve a harmless virus that will express foreign genes like SARS-CoV-2 spike protein	Pre-clinical stage	https://www.greffex.com
Generex Biotechnology	The firm uses insect cells from fruit flies to produce viral antigens	Ex-Vivo Human Immune System screening of 33 Ii-Key-SARS-CoV-2 peptides	https://www.generex.com/covid-19

transmission is not found to be a route for this virus, as pregnant women with COVID-19 had virus negative newborns [6]. The best way suggested by the World Health Organization to limit the epidemic is by social distancing along with practicing good hygiene such as washing your hands regularly and wear protective masks.

5. Vaccination strategies against COVID-19

A study found a correlation between the universal BCG vaccine policy and reduced mortality and morbidity ranges for COVID-19. They found that countries without a universal BCG vaccine policy were more adversely affected by the pandemic compared to

countries having a universal BCG vaccine policy. They also found that BCG vaccination reduced the number of cases in a country [21].

6. In process vaccination strategies against COVID-19

Vaccines help the body enhance the immune response by triggering the generation of antibodies in addition to the development of T and B cells. Vaccines induce active immunity and provide immunological memory which enables the immune system to remember and respond rapidly in case of exposure. Vaccines often provide long-lasting immunity, but sometimes they don't. Scientists at research institutes are working on the development of vaccines all over the world. Vaccine development can take a minimum of 18 months.

7. Lack of antiviral treatment and antiviral treatment studies

In current times, there is no specific antiviral therapy to control this virus only supportive treatment for the coronavirus. Recombinant interferon only has a limited response with ribavirin against a coronavirus infection. The two viral protein inhibitors as an available option of treatment are Baricitinib (Janus and AAK1 kinases inhibitor) and Remdesivir (adenosine analog) [12].

The other antiviral drugs like chloroquine and hydroxychloroquine show an effective response against this virus. The drug chloroquine was first identified in 1934 which is used against SARS-CoV infection, also used to treat other human diseases such as malaria, amoebiosis, HIV, and autoimmune diseases without any side effects.

Leronlimab (CCR5 antagonist) and Galidesivir (nucleoside RNA-polymerase inhibitor) are other possible treatment options [34]. According to guidelines, Interferon-alpha (IFN-alpha) and lopinavir-ritonavir (combined therapy) are recommended antivirals. Chinese medicines, tested to treat influenza H1N1, such as Lianhua Qingwen and ShuFeng Jiedu capsules are also tested against SARS-CoV-2 [7, 18].

The compounds tryptanthrin and indigodole B extracted from the plant Strobilanthes cusia, can reduce the cytopathic effects of human coronavirus NL63. *S. cusia* has also been used to treat SARS-CoV. The spikes of NL63 and SARS-CoV-2 are genetically identical. Hence, *S. cusia* can also be a treatment option for SARS-CoV-2 [33].

Recuperating patients' plasma and antibodies are proposed for treatment. Some vaccine strategies are assessed in animals, including recombinant proteins, DNA vaccines, live and killed attenuated vaccines, and subunit vaccines [6].

8. Precautions

As the virus spread increases with each passing day we have to minimize the transmission cycle by following the different precautionary measures as suggested by the World Health Organization:

- Avoid contact with suspected people.
- Ensure social and physical distancing to prevent the transmission of disease.
- Use of protective surgical masks in public.
- Proper hand washing with sanitizer after every ten minutes.
- Use a mask at all times within an airport facility and outside while traveling.
- Avoid crowded places.
- Avoid contact with unwell people (having flu or cough like symptoms).
- Avoid traveling overseas.
- Ensure good hygiene (wash hand frequently with soap).
- Avoid eating raw or undercooked meat of any type.
- Avoid contact with animals.

9. Conclusion

Coronaviruses are +ssRNA viruses with 7 human coronaviruses, they mainly affect the respiratory system. Group B coronaviruses are the main concern for researchers as it includes the causative virus of the SARS-CoV-2 epidemic. This virus has a high pathogenicity and high virulence rate [41]. SARS-CoV-2 has now spread all around the Globe and is declared a public health emergency by WHO. Its sequence was found to be 96% similar to coronaviruses found in bats [43].

The high transmission rate of the virus is the main concern. Research has been conducted to find effective measures in controlling the speed of the disease with one study reported to minimize person-to-person contact rate to 30% [35]. Real Time Polymerase chain reaction (PCR) with new coronavirus virus-specific primers and probes is the main diagnostic test used to test RNA extracted from a patient [17].

The most commonly reported clinical manifestations are fever, cough, fatigue, and pneumonia. Patients with mild cases recover early, mostly after one week, while serious cases lead to alveolar damage which causes progressive respiratory failure and ultimately leads to death [1]. The genomic nature of this virus is single-stranded RNA which makes it harder to develop vaccines and yet no approved vaccine exists.

Many research groups around the world are working to make vaccines and antivirals as explained in the vaccination and antiviral section above. Some antivirals

that have shown *in-vitro* results against novel coronavirus include chloroquine and remdesivir [36] but the virus has error-prone RNA dependent RNA polymerases that are responsible for mutations and recombination events which are of major concern.

References

1. Adhikari S.P., Meng S., Wu Y.J., Mao Y.P., Ye R.X., Wang Q.Z., Sun C., Sylvia S., Rozelle S., Raat H. et al.: Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect. Dis. Poverty*, **9**, 29 (2020)
2. Banerjee A., Kulcsar K., Misra V., Frieman M., Mossman K.: Bats and Coronaviruses. *Viruses*, **11**, 41 (2019)
3. Baron Y.M.: Could changes in the airborne pollutant particulate matter acting as a viral vector have exerted selective pressure to cause COVID-19 evolution? *Med. Hypotheses*, **146**, 110401–110401 (2021)
4. Callaway E.: COVID vaccine excitement builds as Moderna reports third positive result. *Nature*, **587**, 337–338 (2020)
5. Chan J.F., Yuan S., Kok K.H., To K.K., Chu H., Yang J., Xing F., Liu J., Yip C.C., Poon R.W. et al.: A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person--to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, **395**, 514–523 (2020)
6. Chen H., Guo J., Wang C., Luo F., Yu X., Zhang W., Li J., Zhao D., Xu D., Gong Q. et al.: Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*, **395**, 809–815 (2020)
7. Chen X., Yin Y.-H., Zhang M.-Y., Liu J.-Y., Li R., Qu Y.-Q.: Investigating the mechanism of Shu Feng Jie Du capsule for the treatment of novel Coronavirus pneumonia (COVID-19) based on network pharmacology. *Int. J. Med. Sci.* **17**, 2511–2530 (2020)
8. Chen Y., Liu Q., Guo D.: Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**, 418–423 (2020)
9. de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J.: SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 523–534 (2016)
10. Diaz J.H.: Hypothesis: angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may increase the risk of severe COVID-19. *J. Travel Med.* **27** (2020).
11. Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B.-J., Jiang S.: The spike protein of SARS-CoV – a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 226–236 (2009)
12. Gil C., Ginex T., Maestro I., Nozal V., Barrado-Gil L., Cuesta--Geijo M., Urquiza J., Ramírez D., Alonso C., Campillo N.E. et al.: COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. *J. Med. Chem.* **63**, 12359–12386 (2020)
13. Guo Y.-R., Cao Q.-D., Hong Z.-S., Tan Y.-Y., Chen S.-D., Jin H.-J., Tan K.-S., Wang D.-Y., Yan Y.: The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Med. Res.* **7**, 11 (2020)
14. Jayaweera M., Perera H., Gunawardana B., Manatunge J.: Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy. *Environ. Res.* **188**, 109819–109819 (2020)
15. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K.: COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **24**, 2006–2011 (2020)
16. Latif A.A., Mukaratirwa S.: Zoonotic origins and animal hosts of coronaviruses causing human disease pandemics: A review. *The Onderstepoort J. Vet. Res.* **87**, e1–e9 (2020)
17. Li X., Geng M., Peng Y., Meng L., Lu S.: Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharm. Anal.* **10**, 102–108 (2020)
18. Lu C.W., Liu X.F., Jia Z.F.: 2019-nCoV transmission through the ocular surface must not be ignored. *Lancet*, **395**, e39 (2020)
19. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N. *et al*: Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, **395**, 565–574 (2020)
20. Mackenzie J.S., Smith D.W.: COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Microbiol. Australia*, MA20013-MA20013 (2020)
21. Miller A., Reandelar M.J., Fasciglione K., Roumenova V., Li Y., Otazu G.H.: Correlation between universal BCG vaccination policy and reduced mortality for COVID-19. *medRxiv*, 2020. 2003. 2024. 20042937 (2020)
22. Peiris J.S.M., Guan Y., Yuen K.Y.: Severe acute respiratory syndrome. *Nat. Med.* **10**, S88–S97 (2004)
23. Perlman S., Netland J.: Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439–450 (2009)
24. Rauch S., Jasny E., Schmidt K.E., Petsch B.: New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Front. Immun.* **9**, 1963–1963 (2018)
25. Roper R.L., Rehm K.E.: SARS vaccines: where are we? *Expert Rev. Vaccines*, **8**, 887–898 (2009)
26. Rothan H.A., Byrareddy S.N.: The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.* **109**, 102433 (2020)
27. Salvatori G., Luberto L., Maffei M., Aurisicchio L., Roscilli G., Palombo F., Marra E.: SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN: an optimal immunological target for vaccines. *J. Transl. Med.* **18**, 222 (2020)
28. Simmons G., Reeves J.D., Rennekamp A.J., Amberg S.M., Piefer A.J., Bates P.: Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4240–4245 (2004)
29. Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C.: From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses*, **11**, 59 (2019)
30. Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C.K., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F.: Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* **24**, 490–502 (2016)
31. https://clinicaltrials.gov/
32. Tok TT, G T.: Structures and Functions of Coronavirus Proteins: Molecular Modeling of Viral Nucleoprotein. *Int. J. Virol. Infect. Dis.*, **2(1)**, 001–007 (2017)
33. Tsai Y.-C., Lee C.-L., Yen H.-R., Chang Y.-S., Lin Y.-P., Huang S.-H., Lin C.-W.: Antiviral Action of Tryptanthrin Isolated from Strobilanthes cusia Leaf against Human Coronavirus NL63. *Biomolecules*, **10**, 366 (2020)
34. Velavan T.P., Meyer C.G.: The COVID-19 epidemic. *Trop. Med. Int. Health*, **25**, 278–280 (2020)
35. Wan H., Cui J.-A., Yang G.-J.: Risk estimation and prediction of the transmission of coronavirus disease-2019 (COVID-19) in the mainland of China excluding Hubei province. *Infect. Dis. Poverty*, **9**, 116 (2020)
36. Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., Shi Z., Hu Z., Zhong W., Xiao G.: Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **30**, 269–271 (2020)

37. Weiss S.R., Leibowitz J.L.: Coronavirus pathogenesis. *Adv. Virus Res*. **81**, 85–164 (2011)
38. World Health O.: Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 87. In Geneva: World Health Organization (2020)
39. Worldometers.info: Worldometers. In. https://www.worldometers.info/coronavirus/
40. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J. et al.: Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, **27**, 325–328 (2020)
41. Yang Y., Peng F., Wang R., Yange M., Guan K., Jiang T., Xu G., Sun J., Chang C.: The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J. Autoimmun.*, **109**, 102434 (2020)
42. Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., Huang J.Y., Jiang T., Hou L.H., Li J.X., Yang B.F., Wang L., Wang W.J. et al.: Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*, **396**, 479–488 (2020)
43. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R. et al.: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 21–29
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.03

THANATOMICROBIOME – STATE OF THE ART AND FUTURE DIRECTIONS

Joanna Wójcik[1]*, Marcin Tomsia[2], Artur Drzewiecki[3], Rafał Skowronek[2]

[1] Scientific Society, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia
[2] Department of Forensic Medicine and Forensic Toxicology, Medical University of Silesia
[3] Department of Microbiology, Jagiellonian University in Krakow

Submitted in August 2020, accepted in February 2021

Abstract: Microbiological studies show that there is a possibility of PMI estimation in reference to presence of typical bacteria and fungi on cadaver or in soil beneath. Microbiome after death (thanatomicrobiome) changes and depends on time since death, temperature, seasons and environment- if human remains are covered, buried, placed in ice or left on the surface. To enlarge current knowledge, some of studies are conducted on animal models with further comparison thanatomicrobiome of different animals-pig, rats- to human cadaver thanatomicrobiome. This study collects different branches of thanatomicrobiome studies as a review to summarize current knowledge.

1. Introduction. 2. Living host microbiome and mycobiome. 3. Diseases-related differences. 4. Thanatomicrobiome – human cadavers studies. 5. Fungi presence – thanatomycobiome. 6. Thanatomicrobiome of frozen cadavers. 7. Soil microbial communities changes. 8. Seasons related microbial changes. 9. Thanatomicrobiome and entomology correlation. 10. Conclusions

TANATOMIKROBIOM – AKTUALNY STAN WIEDZY I PRZYSZŁE KIERUNKI

Streszczenie: Prowadzone badania mikrobiologiczne pokazują, że istnieje możliwość szacowania czasu zgonu na podstawie obecności charakterystycznych bakterii i grzybów na zwłokach, jak również na glebie pod szczątkami. Mikrobiom człowieka po śmierci (tanatomikrobiom) zmienia się i jest zależny od czasu jaki upłynął od śmierci, od temperatury, pory roku i środowiska – od tego czy zwłoki były przykryte, zakopane, pozostawione w lodzie czy zostawione na świeżym powietrzu. Aby poszerzyć obszar badań, część z nich przeprowadzana jest na modelach zwierzęcych (świnie, szczury), których zmiany tanatomikrobiomu następnie porównywane są do zmian zachodzących w tanatomikrobiomie ludzkim. Ta praca gromadzi szereg różnych obszarów badań dotyczących mikrobiomu człowieka po śmierci, jako przegląd i podsumowanie dotychczasowej wiedzy i osiągnięć.

1. Wstęp. 2. Mikrobiom i mykobiom żywego organizmu. 3. Różnice związane z chorobami. 4. Tanatomikrobiom – badania na zwłokach ludzkich. 5. Obecność grzybów – tanatomykobiom. 6. Tanatomikrobiom zamrożonych zwłok. 7. Zmiany społeczności bakteryjnych w glebie. 8. Zmiany mikrobiomu związanie z porami roku. 9. Związek tanatomikrobiomu z entomologią. 10.Wnioski

Keywords: bacterial succession, forensic medicine, microbiome, necrobiome, thanatomicrobiome
Słowa kluczowe: sukcesja bakteryjna, medycyna sądowa, mikrobiom, nekrobiom, tanatomikrobiom

1. Introduction

Every human has got their own bacterial flora on their skin, in their gastrointestinal tract, genitourinary system and in the oral cavity, which is called the microbiome [44]. The human microbiome is shaped by many different factors – newborn babies' microbiomes depend on the labor type and way of feeding – natural breast milk or infant formula. Later, the microbiome is related to diet, age, sex, medications taken and diseases. Although microbiome formation varies, in adults, it is relatively stable. The microbiome is characteristic to a living host, but after death, there are specific changes of microbial phyla, genera and families. The microbiome of deceased humans is called the thanatomicrobiome (in Greek mythology Thanatos was the personification of death) [52, 98]. To estimate the PMI (post-mortem interval), a forensic medical examiner uses such indicators as: *pallor mortis*, *algor mortis*, *rigor mortis, livores mortis*, decomposition stages and insect activity – forensic entomology. It is proved that the changes in the thanatomicrobiome are characteristic and repeatable enough to become an additional PMI indicator [98]. Research showed that the sequences of microbial phyla changes are nearly the same among mammals, and thus allow the expansion of the research area to animal models [20, 86].

Microbial communities change not only on cadavers. Burial places and the soil beneath cadavers during decomposition process also undergo microbial phyla changes [31, 88]. Also, like the changes in the thanatomicrobiome, bacteria shifts in soil are characteristic during

* Corresponding author: Joanna Wójcik, MD, Scientific Society, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia, Katowice, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, Poland; 48 32 208 84 37; e-mail: joanna.wojcik.abc@gmail.com

particular decomposition phases. Different authors distinguish various number of decomposition stages – usually three to five decomposition stages appear in studies: fresh, bloat, active decay, advanced decay and the dry remains stage [1]. For each stage, there is a specified bacterial phyla predominance, and increasing or decreasing bacteria abundance over time [83].

2. Living host microbiome and mycobiome

The skin microbiome consists of four main phyla: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The most abundant genera are *Staphylococcus* spp. (mostly *S. epidermidis*), *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium* and *Micrococcus* [42, 67].

In the oral cavity there is tremendous diversity of bacteria [14], predominantly *Streptococcus*, *Veillonella, Fusobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Propionibacterium*, *Eikenella*, *Peptostreptococcus* and *Eubacteria* [67]. Nasal bacteria are *Actinobacteria* (*Propionibacterium* and *Corynebacterium*) and *Firmicutes* (*Staphylococcus* spp.) [33, 42].

The bronchi and lungs are colonized mostly with four phyla: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* [67], [Table I]. The most common bacterial taxon in the esophagus is *Streptococcus*. Additionally, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Neisseria*, and *Veillonella* may be present [75]. The stomach is inhabited by *Proteobacteria* (*Helicobacter pylori*) and *Firmicutes*. In the intestines, two phyla dominate: *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, most of intestinal bacteria are anaerobic: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* and *Ruminococcus* [94]. However, in the intestines, aerobic and obligately anaerobic bacteria are present as well, for instance *Enterobacter* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. [60]. In the vagina, the most abundant are *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* oraz *L. jensenii*) [99].

Microbiomes differ between individuals, and are related to diet, age, sex, weight, health status, antibiotic administration or even with cosmetic use [43]. However, during across a one-year observation period, the intestinal microbiome in each host is relatively stable and varies to a small extent [94].

Fungal diversity in the human gut is much lower than bacterial diversity [74]. The most abundant fungal genus in human stool is *Candida*, followed by *Malassezia* and *Saccharomyces* [74]. *Ascomycota* is the most abundant phylum among fungi, not only in the stool but also in the vagina, oral cavity and skin [74]. In the digestive tract, other sources [30, 82] additionally mention the *Cladosporium* and *Cryptococcus* genera, *Eurotiales* order and *Botrysphaeriales* as a popular family.

On the skin, the most abundant are *Malassezia restrica* and *M. furfur*, but *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. pachydermatis* are also frequently present [79]. *Candida* may be component of the skin mycobiome

Table I
Human microbiome in regard to body areas

Skin	Oral cavity	Bronchi lungs	Nasal	Intestine
Staphylococcus *Corynebacterium* *Propionibacterium* *Brevibacterium* *Micrococcus*	*Streptococcus* *Veillonella* *Fusobacterium* *Neisseria* *Haemophilus* *Propionibacterium* *Eikenella* *Peptostreptococcus* *Eubacteria*	*Pseudomonas* *Streptococcus* *Prevotella* *Fusobacterium* *Haemophilus* *Veilonella* *Porphyromonas*	*Propionibacterium* *Corynebacterium* *Staphylococcus* *Aureobacterium* *Rhodococcus*	*Bacteroides* *Bifidobacterium* *Fusobacterium* *Eubacterium* *Ruminococcus*

Table II
Human mycobiome in regard to body areas

Skin	Oral cavity	Bronchi lungs	Genitourinary system	Intestine
Malassezia furfur *M. restrica* *M. globosa* *M. sympodialis* *M. pachydermatis* *Candida*	*Candida* *Saccharomyces* *Penicillium* *Scopularis* *Geotrichum* *Aspergillus* *Cryptococcus* *Fusarium* *Alternaria*	*Aspergillus* *Candida* *Cladosporium* *Malassezia* *Saccharomyces* *Penicillium*	*Candida* *Saccharomyces* *Aspergillus* *Alternaria* *Cladopsorium*	*Candida* *Saccharomyces* *Cladosporium* *Cryptococcus* *Malassezia* *Eurotiales* *Botrysphaeriales* *Filobasidiales*

but rarely colonize human skin – usually in diabetic patients or during infections [67]. In the oral cavity, *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Scopularis*, *Geotrichum* and *Aspergillus* are present [25, 26]. The bronchial and lung mycobiome is partially determined by oral and nasal fungi which spread through continuity. Therefore, in lower respiratory tract, the most abundant are: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Malassezia* and *Saccharomyces*. In the genitourinary system, the most common are: *Saccharomyces*, *Candida*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Alternaria*.

3. Disease-related differences

During PMI estimation, it is important to know the medical history of the deceased person, because the microbiome in persons suffering from diseases is significantly different than a healthy human microbiome [8, 93].

Chronic alcohol abuse and cirrhosis cause a decrease of *Clostridium* presence and increase of *Proteobacteria* (*Enterobacter*) and *Bacteroides* spp. [93].

Diabetes mellitus patients showed a higher abundance of *Bacteroidetes* and lower percentage of *Firmicutes* in the intestinal microbiota [79]. Necrotizing enterocolitis is correlated with high abundance of *Proteobacteria* [8].

Alzheimer's disease corresponds to an abundance of *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* and their neurotoxin, and the presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in the brain in the hippocampal area [97]. Allergies, cardiovascular diseases, cancer, psychiatric diseases and metabolic syndrome also affect the host microbiome [8].

Although there are no studies considering mistakes in PMI estimation caused by cadavers illnesses, individual abnormalities of quantity or phyla abundance can be compared with characteristic differences in particular disease. If the medical history of the cadaver is known, time since death can be confirmed more precisely, with bacterial number or presence deviation clarified by illness.

4. Thanatomicrobiome – human cadaver studies

A basic difficulty during cadaver studies is the cessation of natural barrier protection. After death, intestinal bacteria can move to the blood and tissues. Additionally other types of bacteria also begin to spread around the entire corpse. This is caused by tissue congestion, vessel enlargement and the unsealing of cell junctions. As a result, organs considered to be sterile can become settled by bacteria, and tissues where there is a specific microbiota can be contaminated by bacteria from other areas. For this reason, the longer the time since death, the lower the accuracy of the research.

Damann *et al.* [18] analyzed ribs of 12 human cadavers and divided decomposition into 3 phases – partially skeletonized, skeletonized and dry remains. It was proved that in two of the prime phases, the thanatomicrobiome was similar to a living human gut microbiome, while the dry remains phase was characterized by a thanatomicrobiome more similar to soil bacterial communities, but was not identical [18]. The partially skeletonized and skeletonized stages had a high abundance of *Firmicutes* and *Proteobacteria*. During decomposition, *Firmicutes* decreased while *Proteobacteria* and *Actinobacteria* started increasing. In contrast to soil samples, cadaver thanatomicrobiomes in the last phase had higher levels of *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Firmicutes* and a smaller quantity of *Acidobacteria*.

DeBruyn *et al.* [56] divided decomposition into 2 phases, and showed that at the beginning, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* predominated. In the late phase of decomposition, *Firmicutes* was still in abundance, while *Bacteroidetes* decreased and *Ignatzschineria* increased.

Mouth thanatomicrobiomes also vary in time – to start with, the main phyla were *Firmicutes* and *Actinobacteria*, while during bloat stage there was an increased number of *Tenericutes*, and growth of *Ignatzschineria* was also remarkable. Dry remains were characterized by a increase of *Firmicutes* with an abundance of *Clostridiales* and *Bacillaceae* [77].

Although an increasing number of studies widen the knowledge about thanatomicrobiome changes, it is worth noticing that scientists discover some differences related to illnesses or sex. For instance, Bell *et al.* [5] proved differences between the thanatomicrobiomes in male and female heart samples [53], taken from 10 cadavers and analyzed 6–58 h since death [Table III]. In male hearts, most abundant phyla was *Firmicutes*, while in females *Proteobacteria* predominated, *Bacteroidetes* was in similar quantity in both sexes. *Bacilli*

Table III
Most abundant phyla in human cadaver according to sex

Heart thanatomicrobiome differences in relation to sex		
	Male	Female
Phylum	*Firmicutes*	*Proteobacteria*
	Bacteroidetes	
Class	*Bacilli*	*Gammaproteobacteria*
Order level	*Lactobacillales* *Rhizobiales*	*Pseudomonadales*
Genus	*Streptococcus* *Lactobacillus*	
Species	*Clostridium* spp.	

and *Streptococcaceae* were detected almost solely in males. *Lactobacillales*, *Rhizobiales* were found only in males, while *Pseudomonadales* and *Gammaproteobacteria* were more abundant in female hearts samples. *Clostridium* sp. was present in both sexes in a similar percentage. *Clostridium* was present in almost all cadaver samples [53]. There is rapid overgrowth after death, because *Clostridium* have the shortest doubling time. *Bacteroides* and *Lactobacillus* spp. decreased as far as decomposition progressed [39].

5. Fungi presence – thanatomycobiome

Although most thanatomicrobiome studies focus on bacteria, studies about fungal presence can be the equally as important in PMI estimation in both humans and animals [13]. Human cadaver research is less frequent due to legal reasons and smaller number of donors, therefore animal research allows to extend more general knowledge on the subject. However, animal PMI estimation is also used independently in forensic veterinary medicine [92].

Research based on human studies showed fungi presence during three stages of decomposition (bloated, putrefaction and skeletonization) [83]. Samples were taken from the cadaver's mouth, skin, rectum, vagina, lungs and grave soil or coffin fragments. In the bloated stage, *Aspergillus flavus* was dominating, followed by *Aspergillus niger* and *Penicillium rugulosum* in all sampling locations. In the purification stage, *Candida albicans* dominated in most samples, except hair, in which the fungal pattern was the same as in bloated stage. The skeletonized stage was dominated by *Penicillium*, with presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* [Table IV].

Tranchida *et al.* [90] describes human cadavers in an advanced decomposition state. In soil samples beneath the remains, *Talaromyces udagawae* (*Aspergillaceae*), registered as human pathogen, was detected, while in control soil samples, there was no signs of *T. udagawae*. In soil samples from under the cadaver, *Dichotomomyces cejpii* and *Talaromyces trachyspermus* were also found. Other fungi – *Mortierella, Mucor hiemalis, Aspergillus* and *Penicillium frequentas* were detected in control soil samples taken 15 meters from the cadaver.

Xiaoliang Fu *et al.* [35] presented differences between fungal succession during decomposition inside and outside, using pigs carcasses. During the decomposition of 3 pigs indoors, *Candida xylopsoci*, *Ascomycota* spp. and *Thermoascus aurantiacus* dominated. The outdoor carcasses decomposed faster and the dominating fungi was *Yarrowia lipolytica*. In soil samples from beneath the carcasses, *Yarrowia lipolytica* and *Candida catenulate* dominated. During the initial decomposition stage, fungal succession on carcasses were similar but as decay proceeded, indoor and outdoor fungal succession started to vary.

6. Thanatomicrobiome of frozen cadavers

A distinct issue is the thanatomicrobiome after long-term freezing. Hyde *et al.* [46] described 2 donated cadavers, the first frozen for 89 days, and the second for 143 days. In both cadavers, most popular phyla in the mouth was *Firmicutes*, followed by *Actinobacteria* on the first cadaver and *Proteobacteria* on the second one. As decomposition progressed, *Actinobacteria* decreased and *Proteobacteria* increased on the first cadaver. A second case, also presented by Hyde [47], described 2 cadavers, one frozen for 22 days and the second for 14 days. *Firmicutes* and *Actinobacteria* increased in the later phases of decomposition. *Firmicutes* and *Bacteroides* predominated in fecal samples before purge, while later stages of decomposition were dominated by *Proteobacteria*. There were differences between the thanatomicrobiome genus in the two cadavers in Hyde's second research – the first cadaver was dominated by *Ignatzschineria*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, while in the second cadaver, *Clostridium*, *Acinetobacter* and *Ignatzschineria* predominated. A third piece of research by Pechal *et al.* [78] was performed on 2 cadavers of children, aged 9 and 13, murdered and frozen by

Table IV
Predominant phyla in 3 decomposition stages in particular corpse parts in order to frequency of appearance

	Hair	Skin	Mucosa	Lungs	Bones	Clothes	Soil
Bloated	*A. flavus* *A. niger* *P. rugulosum*	*A. flavus* *A. niger* *P. rugulosum*	*A. flavus* *A. niger* *P. rugulosum*	*A. flavus* *A. niger* *Penicillium* spp.	–	–	–
Putrefaction	*A. flavus* *A. niger* *Penicillium* spp.	*A.flavus* *C. albicans*	*C. albicans* *C. guilliermondii* *P. piceum*	*C. albicans* –	–	–	–
Skeletonized	*A. flavus* *A. niger* *Penicillium* spp.	–	–	–	*Penicillium* spp. *A. flavus* *A. niger*	*Penicillium* spp. *A. flavus* *A. niger*	*Penicillium* spp. *A. flavus* *A. niger*

mother. In contrast to previous research, in this one, there were observed differences between bacterial diversity during the thawing process. While thawing, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* and *Gammaproteobacteria* increased, and *Firmicutes* decreased. In reference to families – *Corynebacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Pseudomonaceae* and *Tissierllaceae* significantly increased, in contrast to *Prevotellaceae* and *Staphylococcaceae* which decreased.

7. Soil microbial community changes

Soil microbial communities are quite different in comparison to the human microbiome. This knowledge is crucial, because there is the possibility to prove the former presence of a buried or decomposing cadaver based on microbial changes in soil [84]. A second option is estimating PMI by defining microbial communities on remains which are different in decomposition stages and are more similar to soil communities in late stages. Comparison of microbiome changes in the soil requires the appropriate collection of samples to differentiate soil related to thanatomicrobiome changes and a comparative soil sample, which is pure soil without contact with a cadaver and its thanatomicrobiome [90].

Proper sample collection includes taking soil samples right beneath the cadaver (0–5 cm) [17, 31, 84, 90] and control samples. A crucial assumption is receiving soil samples without contact with cadaver – most frequent distances, considered to be adequate, used in soil thanatomicrobiome studies are 1 m, 5 m and 15 m from the body [84, 90, 91].

Garriga *et al.* [2] proved that different bacterial phyla appear in particular decomposition stages, at first, *Proteobacteria*, *Acidobacteria* and *Bacteroidetes* predominate, while in later phases *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* are more abundant, and finally *Firmicutes* and *Proteobacteria* are the most common [2, 30].

Finley *et al.* [31] described a one-year observation of soil microbiota beneath cadavers. Cadavers were divided into two groups – one was cadavers on the surface and the second group was buried bodies. In both groups, the predominant phylum was *Proteobacteria,* but in group of buried cadavers, the quantity of these bacteria was lower. *Acidobacteria* in the buried group was more abundant than in the surface group and in control samples. After 9 months, *Firmicutes* in the surface group was predominant phylum, in contrast to buried group and controls, where the amount of *Firmicutes* was low. *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* were more abundant in the buried group.

Singh *et al.* [84] proved that the soil microbiome beneath cadavers is significantly different than the soil microbiome 1 m and 5 m from the cadaver. Right below the cadaver, the relative abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* was greater, but the amounts of *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* and *Gemmatimonadetes* were smaller. All of the cadavers were placed on a field, and the research included 732 days of sampling.

Cobaugh *et al.* [17] in research on four cadavers compared gut bacteria communities and soil microbiota beneath cadavers. The cadavers' most abundant phyla were *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, while in soil samples, the most common were *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes*. *Actinobacteria* and *Firmicutes* increased while decomposition progressed, in contrast to *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* which decreased.

There is also research on swine buried models [80], and in the soil samples, *Proteobacteria* was most abundant phylum, while the second most abundant phylum was *Bacteroidetes*, with *Firmicutes* increasing in later phases of decomposition. Control soil samples showed a predominance of *Acidobacteria*. Soil beneath the carcasses contained a reduced quantity of *Acidobacteria* but this phenomenon fluctuated in time and when pH raised, *Acidobacteria* abundance increased.

Rabbit decomposition research [92] demonstrated a predominant abundance of *Proteobacteria*, with a presence of *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. An interesting fact is that *Actinobacteria* was in higher abundance during early stages of decomposition, and in the group of rabbits with fur, the abundance of this phylum was definitely higher than in the bald rabbit group. In later stages of decomposition, the percentage of *Actinobacteria* in soil samples was nearly equal in both groups.

8. Season-related microbial changes

Research on rat carcasses considered different decomposition patterns and microbiota in relation to different seasons. In the spring, swabs taken from the small intestine of carcasses showed that the predominant phylum was *Proteobacteria,* followed by *Firmicutes*. In the summer, the predominant phylum was *Firmicutes*. It is noticed that *Enterococcus faecalis* had different growth patterns in the spring and summer, but ultimately in both seasons, the abundance in carcasses was similar [48].

Benbow *et al.* [6] in research on swine carcasses in a river proved that there are some differences in decomposition during different seasons. The generally predominant phylum was *Proteobacteria* followed by *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. In the summer, the decrease of *Proteobacteria* was slower than in the winter. In the winter, while decomposition progressed, *Firmicutes* abundance was, in general, higher than in the summer.

Table V
Correlation between bacteria and insects ocurrence on cadaver

Insect	Necrophagous flies in general	*Sacrophaga* spp.	*Lucilia cuprina*	*Sacrophaga* spp. *Cochliomyia macelluria*
Bacteria genus	*Streptococcus* *Staphylococcus* *Proteus* *Morganella* *Escherichia*	*Myroides* *Ignatzschineria*	*Streptococcus* *Staphylococcus* *Bacillus* *Micrococcus*	*Bacillus* *Providencia* *Escherichia* *Enterococcus* *Ochrobactrum*

In contrast to *Firmicutes*, *Bacteroidetes* was more abundant in the summer during all decomposition stages.

Another research on swine carcasses in water in the autumn and winter [23] showed that there are some bacteria which are season-specific. *Carnobacterium*, *Marinomonas*, *Aeromonas* and *Bacteroidales* Genus 2 and 8 were present in autumn exclusively. *Polaribacter* and *Bacteroidales* Genus 4 were distinctive for winter.

9. Thanatomicrobiome and entomology correlation

After death, not only bacteria exist and graze on cadavers. Within minutes, chemical signals attract the first necrophagous flies [89]. *Calliphora vomitoria* and *Lucilia sericata* are the most numerous insects in Europe detected on cavers, attracted by decomposition odor [34]. Odors are chemical signals, which appear while bacteria start producing postmortem compounds. Bacteria are capable of producing or decomposing substances like indole, ammonia, putrescine, and benzoic acid during cadaver decomposition [66]. Different substances attract various necrophagous flies, but ammonia is considered to be the interkingdom signal that controls the activity of bacteria and blow flies [66]. Also, there is a correlation between insect and bacteria genus occurrence on cadavers [Table V] [89]. Relations between bacteria and blowflies work both ways – some bacteria, like *Proteus mirabilis,* occur on cadavers, transferred by the salivary glands of blowfly *Lucilia sericata. The b*urying beetle transfers its own gut microbiome onto the cadaver – *Morganella*, *Proteus, Providencia, Vagococcus, Xanthomonadaceae* and *Tissirella* [95]. On the other hand, insects, like burying beetles, struggle to obtain the carbohydrates, lipids and proteins present in the cadaver. For this purpose, insects participate in spreading oral secretions that have antibacterial activity, helping to restrain bacterial proliferation [95].

Studies in general focus on the presence of insects on cadavers or on the thanatomicrobiome, and there is only a few examples of research on how both bacteria and insect presence are related [34], [89]. It is clear that presence of some insects entails the appearance of some bacteria phyla and vice versa [89], but future studies may be able to clarify the correlation in later phases of decomposition and enable a precise definition of relations between the development of thanatomicrobiome phyla and insects in particulars decomposition stages.

10. Conclusions

Over the years, knowledge about microbiome changes decisively increased. A constantly rising number of scientific studies and research leads to the possibility of PMI estimation using the thanatomicrobiome. Nowadays, we can distinguish three to five decomposition stages basing on cadaver microbiomes and bacterial community shifts during decay. Moreover, distinctive microbiome changes in the soil beneath the remains, either on the surface or soil beside a buried cadaver, can equally precisely determine the time since death. Distinctive differences occur in thanatomicrobiome changes in water or during the thawing process too. In addition, the microbiome on the cadaver is dependent on the season. Some bacteria can be transferred onto the cadaver by necrophagous insects. Furthermore, the microbiome is not the only indicator we can use in PMI estimations, as fungal changes after death (thanatomycobiome) are also characteristic and specific to different decomposition stages and body parts.

Some research focuses on differences between human decomposition and animal models. The final conclusion is that there is a sufficient similarity in different mammal decomposition stages, and process to expand animal model's records to believable conclusions for the human cadaver decomposition model.

References

1. Adlam R.E., Simmons T.: The effect of repeated physical disturbance on soft tissue decomposition – are taphonomic studies an accurate reflection of decomposition? *J. Forensic Sci.* **52**, 1007–1014 (2007)
2. Adserias-Garriga J., Hernandez M., Quijada N.M., Lazaro D.R., Steadman D., Garcia-Gil J.: Daily thanatomicrobiome changes in soil as an approach of postmortem interval estimation: an ecological perspective. *Forensic Sci. Int.* **278**, 388–395 (2017)

3. Adserias-Garriga J., Hernandez M., Quijada N.M., Lazaro D.R., Steadman D., Garcia-Gil J.: Dynamics of the oral microbiota as a tool to estimate time since death. *Mol. Oral Microbial.* **32**, 511–516 (2017)
4. Barton P.S., Reboldi A., Dawson B.M., Ueland M., Strong C., Wallman J.F.: Soil chemical markers distinguishing human and pig decomposition islands: a preliminary study. *Forensic Sci. Med. Pat.* **16**, 605–612 (2020)
5. Bell C.R., Wilkinson J.E., Robertson B.K., Javan G.T.: Sex-related differences in the thanatomicrobiome in postmortem heart samples using bacterial gene regions v1–2 and v4. *Lett. Appl. Microbiol.* **67**, 144–153 (2018)
6. Benbow M.E., Pechal J.L., Lang J.M., Erb E., Wallace J.R.: The potential of high-throughput metagenomic sequencing of aquatic bacterial communities to estimate the postmortem submersion interval. *J. Forensic Sci.* **60**, 1500–1510 (2015)
7. Benninger L., Carter D., Forbes S.: The biochemical alterations of soil beneath a decomposing carcass. *Forensic Sci. Int.* **180**, 70–75 (2008)
8. Blum H.E.: The human microbiome. *Adv. Med. Sci.* **62**, 414–420 (2017)
9. Burcham Z.M., Cowick C.A., Baugher C.N., Pechal J.L., Schmidt C.J., Rosch J.W., Benbow M.E., Jordan H.R.: Total RNA analysis of bacterial community structural and functional shifts throughout vertebrate decomposition. *J. Forensic Sci.* **64**, 1707–1719 (2019)
10. Burcham Z.M., Hood J.A., Pechal J.L., Krausz K.L., Bose J.L., Schmidt C.J., Benbow M.E., Jordan H.R.: Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. *Forensic Sci. Int.* **264**, 63–69 (2016)
11. Can I., Javan G.T., Pozhitkov A.E., Noble P.A.: Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *J. Microbiol. Meth.* **106**, 1–7 (2014)
12. Carter D.O., Metcalf J.L., Bibat A., Knight R.: Seasonal variation of postmortem microbial communities. *Forensic Sci. Med. Pat.* **11**, 202–207 (2015)
13. Carter D.O., Tibbett M.: Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. *J. Forensic Sci.* **48**, 168–171 (2003)
14. Cernosek T., Eckert K.E., Carter D.O., Perrault K.A.: Volatile organic compound profiling from postmortem microbes using gas chromatography – mass spectrometry. *J. Forensic Sci.* **65**, 134–143 (2019)
15. Chun L.P., Miguel M.J., Junkins E.N., Forbes S.L., Carter D.O.: An initial investigation into the ecology of culturable aerobic postmortem bacteria. *Sci. Justice,* **55,** 394–401 (2015)
16. Clement C., Hill J.M., Dua P., Culicchia F., Lukiw W.J.: Analysis of RNA from Alzheimer's disease post-mortem brain tissues. *Mol. Neurobiol.* **53**, 1322–1328 (2016)
17. Cobaugh K.L., Schaeffer S.M., DeBruyn J.M.: Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. *Plos One,* **10**, e0130201 (2015)
18. Damann F.E., William D.E., Layton A.C.: Potential use of bacterial community succession in decaying human bone for estimating postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **60**, 844–850 (2015)
19. Dash H.R., Das S.: Thanatomicrobiome and epinecrotic community signatures for estimation of post-mortem time interval in human cadaver. *Appl. Microbiol. Biot.* **104**, 9497–9512 (2020)
20. Dautartas A., Kenyhercz M.W., Vidoli G.M., Jantz L.M., Mundorff A., Steadman D.W., Differential decomposition among pig, rabbit and human remains. *J. Forensic Sci.* **63**, 1673–1683 (2018)
21. Dawson B.M., Barton P.S., Wallman J.F.: Contrasting insect activity and decomposition of pigs and humans in an Australian environment: a preliminary study. *Forensic Sci. Int.* **316**, 110515 (2020)
22. Dibner H., Valdez C., Carter D.O.: An experiment to characterize the decomposer community associated with carcasses (*Sus scrofa domesticus*) on Oahu, Hawaii. *J. Forensic Sci.* **64**, 1412–1420 (2019)
23. Dickson G.C., Vass A.A.: Death is in the air: confirmation of decomposition without a corpse. *Forensic Sci. Int.* **301**, 149–159 (2019)
24. Duerkop B.A., Hooper L.V.: Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat. Immunol.* **14**, 654–659 (2013)
25. Dupuy A.K., David M.S., Li L., Heider T.N., Peterson J.D., Montano E.A., Dongari-Bagtzoglou A., Diaz P.I., Strausbaugh L.D.: Redefining of the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *Plos One,* **9**, e90899 (2014)
26. Dworecka-Kaszak B.: Mycobiome – a cross – talk between fungi and their host. XVI Conference DIGMOL 2015, Molecular biology in diagnostics if infectious disease and biotechnology, Warszawa, 2015, s. 67–71
27. Efenberger M., Wódz K., Brzezińska-Błaszczyk E.: Archeony – istotny składnik mikrobiomu człowieka. *Przegl. Lek.* **71**, 346–351 (2014)
28. Fancher J.P., Aitkenhead-Peterson J.A., Farris T., Mix K., Schwab A.P., Wescott D.J., Hamilton M.D.: An evaluation of soil chemistry in human cadaver decomposition island: potential for estimating postmortem interval. *Forensic Sci. Int.* 279, 130–139 (2017)
29. Fernández-Rodríguez A., Cohen M.C. *et al.*: Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 570–579 (2019)
30. Finley S.J., Benbow M.E., Javan G.T.: Microbial communities associated with human decomposition and their potential use as postmortem clocks. *Int. J. Legal Med.* **129**, 623–632 (2015)
31. Finley S.J., Pechal J.L., Benbow M.E., Robertson B.K., Javan G.T.: Microbial signatures of cadaver gravesoil during decomposition. *Microb. Ecol.* **71**, 524–529 (2016)
32. Forger L.V., Woolf M.S., Simmons T.L., Swall J.L., Singh B.: A eukaryotic community succession based method for postmortem interval (PMI) estimation of decomposing porcine remains. *Forensic Sci. Int.* **302**, 109838 (2019)
33. Frank D.N., Feazel L.M., Bessesen M.T., Price C.S., Janoff E.N., Pace N.R.: The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *Plos One*, **5**, e10598 (2010)
34. Frederickx C., Dekeirsschieter J., Verheggen F.J., Haubruge E.: Responses of *Lucilia sericata* Meigen (diptera: *Calliphoridae*) to cadaveric volatile organic compounds. *J. Forensic Sci.* **57**, 386–390 (2012)
35. Fu X., Guo J., Finkelbergs D., He J., Zha L., Guo Y., Cai J.: Fungal succession during mammalian cadaver decomposition and potential forensic implications. *Sci. Rep.* **9**, 12907 (2019)
36. Grice E.A., Serge J.A.: The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 244–253 (2011)
37. Handke J., Procopio N., Buckley M., Van Der Meer D., Williams G., Caar M., Williams A.: Successive bacterial colonisation of pork and its implications for forensic investigations. *Forensic Sci. Int.* **281**, 1–8 (2017)
38. Harrison L., Kooienga E., Speights C., Tomberlin J., Lashley M., Barton B., Jordan H.: Microbial succession from a subsequent secondary death event following mass mortality. *BMC Microbiol.* **20**, 309 (2020)
39. Hauther K.A., Cobaugh K.L., Jantz L.M., Sparer T.E., DeBruyn J.M.: Estimating time since death from postmortem human gut microbial communities. *J. Forensic Sci.* **60**, 1234–1240 (2015)
40. Hitosugi M. *et al.*: Fungi can be a useful forensic tool. *Legal Med.* **8**, 240–242 (2006)

41. Hoffmann C., Dollive S., Grunberg S., Chen J., Li H., Wu G.D., Lewis J.D., Bushman F.D.: Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *Plos One,* **8**, e66019 (2013)
42. Hoffmann A.R., Proctor L.M., Surette M.G., Suchodolski J.S.: The microbiome: the trillions of microorganisms that maintain health and cause disease in humans and companion animals. *Vet. Pathol.* **53**, 10–21 (2016)
43. Holland K.T., Bojar R.A.: Cosmetics: what is their influence on the skin microflora? *Am. J. Clin. Dermatol.* **3**, 445–449 (2002)
44. Hooper L.V., Gordon J.I.: Commensal host – bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115–1118 (2001)
45. Hopkins D.W., Wiltshire P.E.J., Turner B.D.: Microbial characteristics of soils from graves: an investigation at the interface of soil microbiology and forensic science. *Appl. Soil Ecol.* **14**, 283–288 (2000)
46. Hyde E.R., Haarmann D.P., Lynne A.M., Bucheli S.R., Petrosino J.F.: The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *Plos One*, e77733 (2013)
47. Hyde E.R., Haarmann D.P., Petrosino J.F., Lynne A.M., Bucheli S.R.: Initial insights into bacterial succession during human decomposition. *Int. J. Legal Med.* **129**, 661–671 (2015)
48. Iancu L., Junkins E.N., Necula-Petrareanu G., Purcarea C.: Characterizing forensically important insect and microbial community colonization patterns in buried remains. *Sci. Rep.* **8**, 15513 (2018)
49. Ishii K., Hitosugi M., Kido M., Yaguchi T., Nishimura K., Hosoya T., Tokudome S.: Analysis of fungi detected in human cadavers. *Legal Med.* **8**, 188–190 (2006)
50. Javan G.T., Can I., Finley S.J., Soni S.: The apoptotic thanatotranscriptome associated with the liver of cadavers. *Forensic Sci. Med. Phatol.* **11**, 509–516 (2015)
51. Javan G.T., Finley S.J., Abidin Z., Mulle J.G.: The thanatomicrobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death. *Front. Microbiol.* **7,** 225 (2016)
52. Javan G.T., Finley S.J., Can I., Wilkinson J.E., Hanson J.D., Tarone A.M.: Human thanatomicrobiome succession and time since death. *Sci. Rep.* **6**, 29598 (2016)
53. Javan G.T., Finley S.J., Smith T., Miller J., Wilkinson J.E.: Cadaver thanatomicrobiome signatures: the ubiquitous nature of clostridium species in human decomposition. *Front. Microbiol.* **8**, 2096 (2017)
54. Javan G.T., Finley S.J., Tuomisto S., Hall A., Benbow M.E., Mills D.E.: An interdisciplinary review of thanatomicrobiome in human decomposition. *Forensic Sci. Med. Pat*. **15**, 75–83 (2019)
55. Javan G.T., Kwon I., Finley S.J., Lee Y.: Progression of thanatophagy in cadaver brain and heart tissues. *Biochem. Biophys. Rep.* **5**, 152–159 (2016)
56. Jennifer M., DeBruyn J.M., Hauther K.A.: Postmortem succession of gut microbial communities in deceased human subjects. *PeerJ,* **5**, 3437 (2017)
57. Johnson H.R., Trinidad D.D., Guzman S., Khan Z., Parziale J.V., DeBruyn J.M., Lents N.H.: Machine learning approach for using the postmortem skin microbiome to estimate the postmortem interval. *Plos One*, **11**, e0167370 (2016)
58. Junkins E.N., Speck M., Cartera D.O.: The microbiology, pH, and oxidation reduction potential of larval masses in decomposing carcasses on Oahu, Hawaii. *J. Forensic Leg. Med.* **67**, 37–48 (2019)
59. Kaszubinski S.F., Receveur J.P., Wydra B., Smiles K., Wallace J.R., Babcock N.J., Weatherbee C.R., Benbow M.E.: Cold case experiment demonstrates the potential utility of aquatic microbial community assembly in estimating a postmortem submersion interval. *J. Forensic Sci*. **65**, 1210–1220 (2020)
60. Krakowiak O., Nowak R.: Mikroflora przewodu pokarmowego człowieka – znaczenie, rozwój, modyfikacje. *Postępy Fitoterapii,* **3**, 193–200 (2015)
61. Lang J.M., Erb R., Pechal J.L., Wallace J.R., McEwan R.W., Benbow M.E.: Microbial biofilm community variation in flowing habitats: potential utility as bioindicators of postmortem submersion intervals. *Microorganisms,* **4**, 1 (2016)
62. Lawrence K.E., Lam K.C., Morgun A., Shulzhenko N., Löhr C.V.: Effect of temperature and time on the thanatomicrobiome of the cecum, ileum, kidney, and lung of domestic rabbits. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**, 155–163 (2019)
63. Lecuit M., Eloit M.: The human virome: new tools and concept. *Trends Microbiol*. **21**, 510–515 (2013)
64. Li H., Xu J. *et al.*: Molecular characterization of gut microbial shift in SD rats after death for 30 days. *Arch. Microbiol.* **202**, 1763–1773 (2020)
65. Liu Q., Sun Q., Liu Y., Zhou L., Zheng N., Liu L.: Bioluminescent assay of microbial ATP in postmortem tissues for the estimation of postmortem interval. *J. Huazhong Univ. Sci.* **29**, 679–683 (2009)
66. Ma Q., Fonseca A., Liu W., Fields A.T., Pimsler M.L., Spindola A.F., Tarone A.M., Crippen T.L., Tomberlin J.K., Wood T.K.: Proteus mirabilis interkingdom swarming signals attract blow flies. *ISME J*. **6**, 1356–1366 (2012)
67. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom człowieka. *Post. Mikrobiol.* **56**, 33–42 (2017)
68. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom układu oddechowego w warunkach fizjologicznych i patologicznych. *Post. Mikrobiol.* **55**, 279–283 (2016)
69. Mann R.W., Bass W.M., Meadows L.: Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *J. Forensic Sci*. **35**, 103–111 (1990)
70. Maujean G., Guinet T., Fanton L., Malicier D.: The interest of postmortem bacteriology in putrefied bodies. *J. Forensic Sci.* **58**, 1069–1070 (2013)
71. Metcalf J.L., Xu Z.Z., Weiss S., Lax S., Treuren W.V.: Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science,* **351**, 6269 (2016)
72. Metcalf J.L.: Estimating the postmortem interval using microbes: knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Sci. Int. Gen.* **38**, 211–218 (2019)
73. Micozzi M.S.: Experimental study of postmortem change under field conditions: effects of freezing, thawing and mechanical injury. *J. Forensic Sci.* **31**, 953–961 (1986)
74. Nash A.K., Petrosino J.F. *et al.*: The gut mycobiome of the human microbiome project healthy kohort. *Microbiome,* **5**, 153 (2017)
75. Park C.H., Lee S.K.: Exploring esophageal microbiomes in esophageal diseases: a systematic review. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **26,** 171–179 (2020)
76. Paulino L.C., Tseng C.T., Strober B.E., Blaser M.J.: Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesion. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2933–2941 (2006)
77. Pechal J.L., Schmidt C.J., Jordan H.R., Benbow M.E.: A large-scale survey of the postmortem human microbiome, and its potential to provide insight into the living health condition. *Sci. Rep.* **8**, 5724 (2018)
78. Pechal J.L., Schmidt C.J., Jordan H.R., Benbow M.E.: Frozen: thawing and its effect on the postmortem microbiome in two pediatric cases. *J. Forensic Sci*. **62**, 1399–1405 (2017)
79. Pedersen H.K., Gudmundsdottir V., Nielsen H.B., Hyotylainen T., Nielsen T., Jensen B.A., *et al.*: Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature,* **535**, 376–381 (2016)
80. Procopio N., Ghignone S., Williams A., Chamberlain A., Mello A., Buckley M.: Metabarcoding to investigate changes

in soil microbial communities within forensic burial contexts. *Forensic Sci. Int. Gen.* **39**, 73–85 (2019)
81. Procopio N., Ghignone S., Voyron S., Chiapello M., Williams A., Chamberlain A., Mello A., Buckley M.: Soil fungal communities investigated by metabarcoding within simulated forensic burial contexts**.** *Front. Microbiol.* **11,** 1686 (2020)
82. Santiago-Rodriguez T.M., Fornaciari G., Luciani S., Toranzos G.A., Marota I., Giuffra V., Cano R.J.: Gut microbiome and putative resistome of Inca and Italian nobility mummies. *Genes*, **8**, 310 (2017)
83. Sidrim J.C., Moreira Filho R.E., Cordeiro R.A., Rocha M.F.G., Caetano E.P., Monteiro A.J., Brilhante R.S.N.: Fungal microbiota dynamics as a postmortem investigation tool: focus on *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* species. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1751–1756 (2010)
84. Singh B., Minick K.J., Strickland M.S., Wickings K.G., Crippen T.L., Tarone A.M., Benbow M.E., Sufrin N., Tomberlin J.K., Pechal J.L.: Temporal and spatial impact of human cadaver decomposition on soil bacterial and arthropod community structure and function. *Front. Microbiol*. **8**, 2616 (2017)
85. Spagnolo E.V., Stassi C., Mondello C., Zerbo S., Milone L., Argo A.: Forensic microbiology applications: a systematic review. *Leg. Med.* **36**, 73–80 (2019)
86. Stokes K.L., Forbes S.L., Tibbett M.: Human versus animal: contrasting decomposition dynamics of mammalian analogues in experimental taphonomy. *J. Forensic Sci.* **58**, 583–591 (2013)
87. Strużycka I.: The oral microbiome in dental caries. *Pol. J. Microbiol*. **63**, 127–135 (2014)
88. Thomas T.B., Finley S.J., Wilkinson J.E., Wescott D.J., Gorski A., Javan G.T.: Postmortem microbial communities in burial soil layers of skeletonized humans. *Leg. Med.* **49,** 43–49 (2017)
89. Thompson C.R., Brogan R.S., Scheifele L.Z., Rivers D.B.: Bacterial interactions with necrophagous flies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **106**, 799–809 (2013)
90. Tranchida M.C., Centeno N.D., Cabello M.N.: Soil fungi: their potential use as a forensic tool. *J. Forensic Sci.* **59**, 785–789 (2014)
91. Tranchida M.C., Centeno N.D., Stenglein S.A., Cabello M.N.: First record of *Talaromyces udagawae* in soil related to decomposing human remains in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **48**, 86–90 (2016)
92. Tuccia F., Zurgani E., Bortolini S., Vanin S.: Experimental evaluation on the applicability of necrobiome analysis in forensic veterinary science. *MicrobiologyOpen,* **8**, e00828 (2019)
93. Tuomisto S., Pessi T., Collin P., Vuento R., Aittoniemi J., Karhunen P.J.: Changes in gut bacterial populations and their translocation into liver and ascites in alcoholic liver cirrhotics. *BMC gastroenterol*. **14**, 40 (2014)
94. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project. *Nature*, **449**, 804–810 (2007)
95. Vogel H., Shukla S.P., Engl T., Weiss B., Fischer R., Steiger S., Heckel D.G., Kaltenpoth M., Vilcinskas A.: The digestive and defensive basis of carcass utilization by the burying beetle and its microbiota. *Nat. Commun.* **9**, 15186 (2017)
96. Wilson A.S., O'Keefe S.J.D. *et al.*: Diet and the human gut microbiome: an international review. *Dig. Dis. Sci*. **65**, 723–740 (2020)
97. Zhao Y., Jaber V., Lukiw W.J.: Secretory products of the human gl tract microbiome and their potential impact on Alzheimer's disease (AD): detection of lipopolysaccharide (LPS) in AD hippocampus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 318 (2017)
98. Zhou W., Bian Y.: Thanatomicrobiome composition profiling as a tool for forensic investigation. *Forensic Sci. Res.* **3**, 105–110 (2018)
99. Zhou X., Brown C., Abdo Z., Davis C.C., Hansmann M.A., Joyce P., Foster J.A., Forney L.J.: Differences in the decomposition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and Black women. *ISME J.* **1**, 121–133 (2007)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 31–46
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.04

LUDZKI MYKOBIOM W STANACH NORMOBIOZY I DYSBIOZY – CHARAKTERYSTYKA I METODY ANALIZY

Sebastian Gnat[1]*, Dominik Łagowski[1], Mariusz Dyląg[2], Aneta Nowakiewicz[1]

[1] Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej
[2] Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mykologii i Genetyki

Wpłynęło we wrześniu, zaakceptowane w grudniu 2020 r.

Streszczenie: Choroby grzybicze dotykają rocznie ponad 300 milionów ludzi na całym świecie, powodując ponad 1,6 miliona zgonów. Nawet przy tak wysokim współczynniku chorobowości infekcji grzybiczych, stosunkowo niewiele gatunków grzybów jest patogenami, a inwazyjne infekcje grzybicze u zdrowych osób są rzadkością. Analizy porównawcze mykobiomów ujawniają, że ludzki organizm kolonizowany jest przez odpowiednie grzyby wkrótce po urodzeniu, a ilościowy i jakościowy skład tej mykobioty zmienia się w trakcie życia. W ostatnich latach prowadzone są analizy korelacji między strukturą mykobiomu i stanem zdrowia, jak również w kontekście stanów chorobowych, na poziomie interakcji grzyb-mykobiom-gospodarz. Zależność pomiędzy zasiedlanym przez grzyby obszarem ludzkiego ciała tzw. lokalizacją anatomiczną, a swoistymi dla tego obszaru gatunkami grzybów, pozwala wnioskować o istnieniu silnej presji selekcyjnej wybiórczo promującej rozwój gatunków swoistych dla danej niszy ekologicznej w obrębie organizmu. Inną kwestię stanowi walidacja i standaryzacja metod analizy mykobiomów. W tym aspekcie szczególnym zainteresowaniem cieszą się obecnie metody sekwencjonowania metagenomicznego. W tej pracy została zaprezentowana aktualna wiedza na temat mykobiomu w stanach fizjologicznych i chorobowych mających źródło w dysbiozie ukształtowanego już mikrobiomu. Omówione zostały również metody i wyzwania diagnostyczne w ilościowej i jakościowej analizie mykobiomów.

1. Wprowadzenie. 2. Mykobiom w zdrowiu i chorobie. 2.1. Mykobiom płuc. 2.2. Mykobiom jelit. 2.3. Mykobiom skóry. 2.4. Mykobiom a zaburzenia neurologiczne. 2.5. Mykobiom środowiskowy. 3. Badania nad mykobiomem w praktyce klinicznej. 4. Analiza mykobiomów: metodologie i wyzwania. 4.1. Przetwarzanie próbki. 4.2. Sekwencjonowanie amplikonów. 4.3. Sekwencjonowanie metagenomiczne. 4.4. Wyzwania bioinformatyczne. 5. Podsumowanie

HUMAN MYCOBIOME IN NORMOBIOSIS AND DYSBIOSIS STATES CHARACTERISTICS AND ANALYSIS METHODS

***Abstract*:** Fungal diseases affect over 300 million people worldwide each year and cause over 1.6 million deaths. Even with such a high prevalence of fungal infections, relatively few fungal species are pathogens, and invasive fungal infections are rarely diagnosed in healthy subjects. Comparative analyses of mycobiomes reveal that the human organism is colonized by specific fungi soon after birth, and the quantitative and qualitative composition of the mycobiota changes throughout life. In recent years, correlations between the mycobiome structure and health status, also in disease conditions, have been analyzed at the level of fungus-mycobiome-host interactions. The relationship between the colonized area of the human body defined as anatomical location, and fungal species specific for this area, indicates a strong selective pressure that promotes the growth of species specific for a given ecological niche within the organism. Another issue is the validation and standardization of mycobiome analysis methods. In this respect, metagenomic sequencing methods are currently arousing considerable interest. The review presents the current knowledge about the mycobiome in physiological and disease states induced by the dysbiosis of the existing microbiome. The methods and diagnostic challenges in the quantitative and qualitative analysis of mycobiomes are discussed as well.

1. Introduction. 2. Mycobiome in health and disease states. 2.1. Pulmonary mycobiome. 2.2. Intestinal mycobiome. 2.3. Skin mycobiome. 2.4. Mycobiome and neurological disorders. 2.5. Environmental mycobiome. 3. Mycobiome studies in clinical practice. 4. Analysis of mycobiomes: methodologies and challenges. 4.1. Sample processing. 4.2. Amplicon sequencing. 4.3. Metagenomic sequencing. 4.4. Bioinformatics challenges. 5. Summary

Słowa kluczowe: mykobiom, mikrobiom, dysbioza, grzyby, analizy metagenomiczne
Keywords: mycobiome, microbiome, dysbiosis, fungi, metagenomic analyses

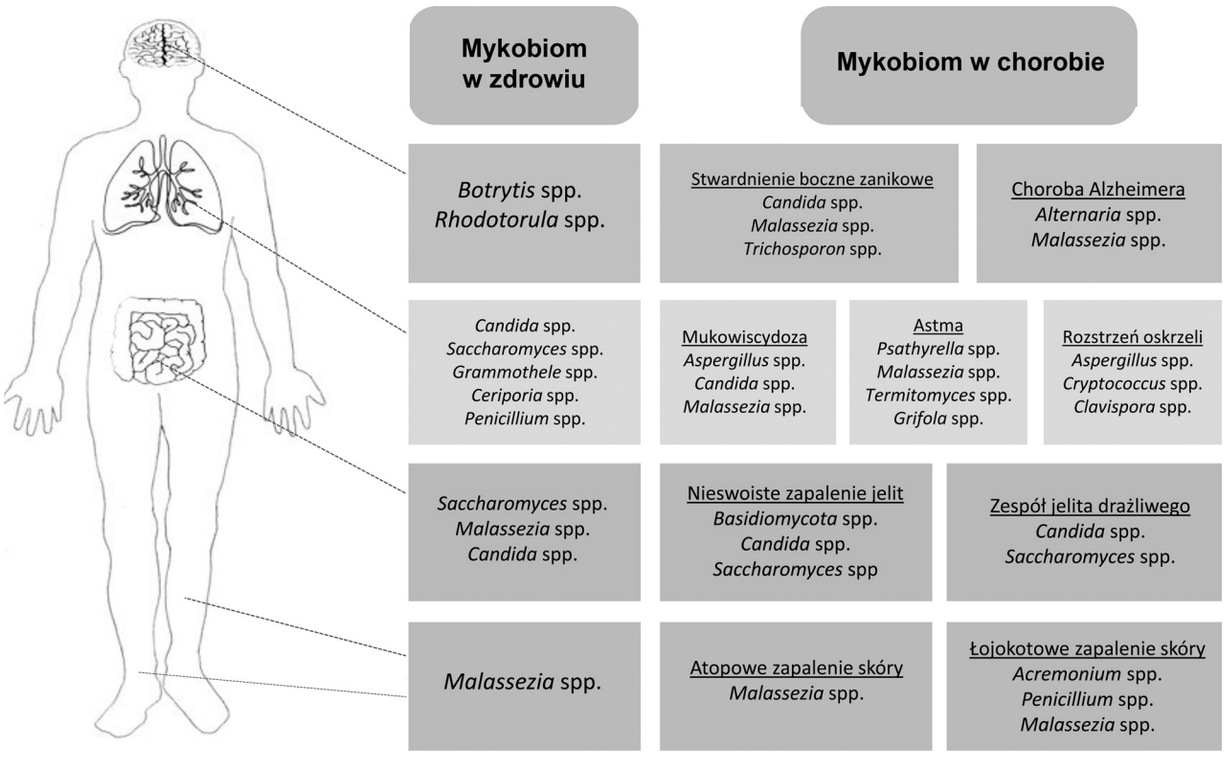
1. Wprowadzenie

Każdego roku choroby grzybicze występują u ponad 300 milionów ludzi na całym świecie, powodując ponad 1,6 miliona zgonów [17, 38]. Pomimo tak wysokiej w skali roku zapadalności na grzybice, niewiele gatunków grzybów jest patogenami, a inwazyjne infekcje grzybicze (IFIs, Invasive Fungal Infections) u osób immunokompetentnych są rzadkością [103]. IFIs stanowią jednak problem dla pacjentów z obniżoną

* Autor korespondencyjny: Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

odpornością, u których wiążą się z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością. Przypadki IFIs wpisują się też w globalny trend wzrostu liczby zakażeń grzybiczych wśród podatnych populacji [17, 41, 42, 69, 71]. W grupie szczególnego ryzyka wymieniane są osoby zakażone ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV), pacjenci z nowotworami oraz po transplantacjach, poddawani terapii immunosupresyjnej lub immunomodulującej [45]. Pośredni wpływ na wzrost liczby przypadków grzybic w skali roku ma globalne ocieplenie i zmiany klimatu, których skutkami są wyższa przeżywalność grzybów w środowisku [21, 37]. Ponadto, obserwowana jest aklimatyzacja grzybów do coraz wyższych temperatur, co zwiększa ich zdolność do replikacji w organizmie gospodarza, nawet przy podwyższonej temperaturze ciała [37, 46]. Przeżywalność komórek niektórych szczepów grzybów w wyższych niż typowe dla gatunku temperatury maksymalne, jest przejawem poszerzenia się spektrum czynników promujących rozwój w ustroju człowieka, przez co w konsekwencji czynnikami sprawczymi grzybic stają się gatunki dotychczas uważane za niepatogenne [103]. Proces aklimatyzacji wpływa również na rozmieszczenie grzybów w środowisku i umożliwia ich wzrost w cieplejszych niszach ekologicznych, co ułatwia interakcję komórek patogenów z organizmem człowieka i transmisję choroby na drodze zakażenia przez skórę, jamę ustną lub przez jamę nosową [36]. Wymienione czynniki przyczyniają się do zwiększenia różnorodności mykobioty organizmu człowieka i otaczającego go środowiska, a pośrednio do wzrostu zagrożenia związanego z infekcjami o charakterze endogennym [72].

Termin mykobiom jest używany do opisania grzybiczego składnika mikrobiomu. Nie jest jeszcze wiadome, czy istnieje u ludzi mykobiom rdzenny, jak w przypadku bakteriomu. W porównaniu z bakteriomem (> 99% całkowitej mikrobioty), ludzki mykobiom jest mniej zróżnicowany, zwykle nie przekraczający 20. taksonomicznych jednostek operacyjnych na próbkę (OTU, Operational Taxonomic Unit) i występuje w mniejszej ilości (≤ 0,1% całkowitej masy mikrobioty) [77, 86]. Wieloletnie badania nad składem ludzkiego mikrobiomu przewodu pokarmowego również ujawniają, że udział komponentu grzybowego plasuje się w zakresie od 0,001 do 0,1% populacji mikroorganizmów izolowanych z dróg pokarmowych [12]. Badania oparte o sekwencjonowanie genomów ujawniają obecność w drogach pokarmowych niemowląt grzybów z rodzaju *Candida*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Cryptococcus* i *Malassezia* [74]. O ile w przypadku wymienionych dwóch pierwszych rodzajów wiąże się to z kolonizacją odpowiednich odcinków układu pokarmowego, występowanie grzybów z trzech pozostałych rodzajów związane jest raczej z ich przejściową obecnością i nie mogą być one postrzegane jako typowe komponenty tej ontocenozy [110]. Natomiast mykobiomy zdrowych osób dorosłych wykazują przewagę grzybów z rodzaju *Saccharomyces*, *Candida, Trichosporon* i *Galactomyces*, co sugeruje, że są one kluczowymi składnikami zdrowego mykobiomu obecnego przez całe życie [24, 77]. Niemniej jednak, w przeciwieństwie do badań ludzkich bakteriomów, odnotowana jest niewielka korelacja pomiędzy profilem gatunkowym mykobiomu i stanem zdrowia, a dane na temat interakcji grzyb-mykobiom-gospodarz ograniczone są do przypadków kolonizacji przez grzyby różnych lokalizacji anatomicznych w stanach chorobowych (Ryc. 1) [25]. Dostępne wyniki badań naukowych wskazują, że skomplikowane systemy immunologiczne są zaangażowane w utrzymywanie względnie stałej równowagi w jakościowym i ilościowym składzie mykobiomów. Zaburzenie tej swoistej równowagi zwykle prowadzi do rozwoju infekcji grzybiczej bądź bakteryjnej lub w sposób pośredni wpływa na rozwój takich jednostek chorobowych jak atopowe zapalenie skóry (AZS), czy łojotokowe zapalenie skóry [89]. Odpowiedź immunologiczna na obecność komórek grzybów w ustroju, w pierwszym etapie opiera się na właściwym rozpoznaniu komórek patogenu. Za ten proces odpowiadają receptory rozpoznające wzorce (PRR, Pattern Recognition Receptors), które są obecne na powierzchni lub w cytoplazmie komórek układu odpornościowego. Receptory te, rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenami, swoiste dla patogennych grzybów, co indukuje uwalnianie określonych interleukin. Obecne w błonach komórkowych makrofagów receptory PRR rozpoznają mannany i adhezyny obecne w ścianach komórkowych wielu grzybów, wyzwalając aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB, produkcję interleukin: IL-1β i IL-6 oraz fagocytozę. Niektóre rodzaje grzybów, jak *Candida* dzięki stosowaniu tzw. mimikry molekularnej są w stanie uniknąć rozpoznania obecnych na powierzchni ich komórek reszt mannozy przez komórki układu odpornościowego gospodarza, co skutkuje brakiem właściwej odpowiedzi immunologicznej, nasilając infekcję lub prowadząc do infekcji przewlekłej [106]. Ograniczona liczba gatunków grzybów, które faktycznie zasiedlają różne obszary anatomiczne ludzkiego ciała, może wskazywać na zachowawczość ewolucyjną w odniesieniu do składników ludzkiego mykobiomu [49], przejawiającą się też w wyjątkowo wąskiej specjalizacji pewnych gatunków do określonych nisz ekologicznych [25]. Klasycznym przykładem dla poparcia tego stwierdzenia są grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Malassezia.* W kontekście ludzkiego mykobiomu, królestwo grzybów wykazuje mniejszą różnorodność niż bakterii, co najlepiej widać w odniesieniu do mykobiomu skóry, gdzie wyraźnie dominują gatunki z rodzaju *Malassezia* [54, 83]. Obserwowane są również zależności między lokalizacją anatomiczną, a swoistymi dla niej gatunkami



Ryc. 1. Skład gatunkowy mykobiomu różnych narządów w stanie zdrowia i w wybranych jednostkach chorobowych

grzybów. Może to wskazywać na istnienie silnej presji selekcyjnej w kontekście możliwości adaptacji poszczególnych gatunków do specyficznych nisz ekologicznych organizmu człowieka [83, 89]. W kontekście tego typu rozważań należy jednak zawsze mieć na uwadze, czy stwierdzenie występowania danego gatunku grzyba w obrębie badanej lokalizacji anatomicznej, nie jest związane wyłącznie z przejściową obecnością drobnoustroju wprowadzonego chociażby z pokarmem.

Obecnie w badaniach mykobiomów największym zainteresowaniem cieszą się techniki metagenomiczne. Techniki te umożliwiają pozyskiwanie DNA genomowego drobnoustrojów bezpośrednio z próbek środowiskowych, niezależnie od rodzaju próbki i liczby różnych gatunków drobnoustrojów. Niewątpliwie zaletą tej metody jest to, że daje możliwość zbadania całej puli genetycznej zbiorowisk drobnoustrojów poprzez sekwencjonowanie i późniejszą analizę uzyskanych sekwencji nukleotydowych. Wewnętrzny transkrybowany przerywnik (ITS Internal Transcribed Spacer) obejmujący dwa zmienne podregiony ITS1 i ITS2 jest zlokalizowany w rejonie genów rybosomalnego RNA i wykorzystywany jest jako uniwersalny i rekomendowany marker DNA w identyfikacji gatunków grzybów, w próbkach metagenomicznych.

Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu piśmiennictwa traktującego o aktualnych danych związanych z różnorodnością mykobiomu ludzkiego. Ponadto, omówione zostały kluczowe prace badawcze, w których technologia sekwencjonowania, w tym sekwencjonowania metagenomicznego znalazła zastosowanie diagnostyczne w ocenie ludzkiego mykobiomu.

2. Mykobiom w zdrowiu i chorobie

2.1. Mykobiom płuc

Grzybicze choroby płuc są obecnie szeroko rozpowszechnione i stanowią coraz większy problem zdrowia publicznego na całym świecie. Brak jest jednak specjalistycznych badań nad mykobiomami płuc, których celem byłoby przeprowadzenie analiz porównawczych między mykobiomami płuc osób zdrowych i tych z przewlekłymi chorobami płuc. Utrudnia to zdefiniowanie i ocenę różnorodności mykobiomu w tym narządzie. Wcześniejsze założenia sterylności zdrowego płuca zatrzymały badania mikrobiomu tego narządu na wiele lat. W efekcie, zrozumienie mikrobiomu oddechowego jest znacznie opóźnione w porównaniu z innymi organami [65]. Pojawienie się technologii sekwencjonowania, jako metody niezależnej od uzyskania kultury grzyba, ujawniło różnorodność mikroorganizmów występujących w płucach, w tym obecnych w płucach osób zdrowych [9]. Dzięki obserwowanej w ostatnich latach znacznej redukcji kosztów sekwencjonowania o wysokiej przepustowości możliwe jest wyodrębnianie prawie kompletnych genomów

bezpośrednio z metagenomicznych zestawów danych. Z kolei, badania oparte o sekwencjonowanie regionu ITS ujawniły, że w skład mykobiomu płuc mogą wchodzić grzyby klasyfikowane jako *Ceriporia lacerata*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Penicillium brevicompactum*, przy czym za najważniejszy czynnik etiologiczny aspergilozy i główny patogen w warunkach dysbiozy jest postrzegany niezmiennie *Aspergillus fumigatus* [27]. Konidia tego gatunku, z uwagi na najdrobniejsze wśród rodzaju *Aspergillus* rozmiary, mogą wnikać do przestrzeni pęcherzyków płucnych. Mikrobiota stwierdzana w zdrowych płucach obejmuje oprócz grzybów także bakterie i wirusy, które razem na poziomie różnych taksonów tworzą międzygatunkową sieć ekologiczną [74, 105]. Wspomniane czynniki biologiczne najczęściej dostają się do dróg oddechowych na drodze inhalacji, wchodząc w bezpośredni kontakt z warstwą śluzu pokrywającą powierzchnie poszczególnych odcinków dróg oddechowych. W tym kontekście, analizując wyniki badań nad mikrobiomem płuc należy mieć na uwadze, że stwierdzane tam mikroorganizmy i wirusy mogą stanowić jedynie przejściową mikrobiotę płuc, która zwykle jest aktywnie usuwana. Ponadto wykazano, że możliwe są również interakcje między mikrobiomem płucnym i jelitowym, które zachodzą poprzez oś płuca-jelita i mają istotne konsekwencje zdrowotne. Udowodniono, że zmiany w mykobiomie jelitowym mogą wpływać na powstawanie alergicznych chorób dróg oddechowych [14,92]. Na modelu mysim wykazano między innymi, że nadmierna proliferacja *Candida albicans* w jelitach wyraźnie nasila przebieg alergicznej choroby dróg oddechowych [92]. Podobnie, sztucznie indukowana u myszy kolonizacja jelit przez grzyba *Wallemia mellicola* prowadziła do zwiększonego nasilenia alergicznej choroby dróg oddechowych [92].

Mykobiom zdrowych płuc różni się od obserwowanego u pacjentów z przewlekłymi chorobami układu oddechowego, takimi jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, mukowiscydoza i rozstrzenie oskrzeli [78]. Wszystkie płuca badanych osób cierpiących z powodu astmy, obturacyjnej choroby płuc i mukowiscydozy wykazywały mniejszą różnorodność mykobiomów [104]. W grupie pacjentów z astmą stwierdzano w płucach zdecydowanie większy udział różnych gatunków grzybów, w tym najczęściej *Psathyrella candolleana*, *Malassezia pachydermatis*, *Termitomyces clypeatus* i *Grifola sordulenta* [77,103]. Ponadto, zwraca uwagę fakt większej różnorodności gatunkowej grzybów w porównaniu z pulą gatunków izolowanych z dróg oddechowych zdrowych osób, u których do tej pory nie stwierdzano w płucach niektórych z wymienionych gatunków, jak chociażby tych z rodzaju *Malassezia* [77]. U dzieci z ciężką astmą stwierdzono większą liczebność grzybów z taksonów *Pneumocystis*, *Leucosporidium* i *Rhodotorula* w porównaniu z grupą dzieci zdrowych [47]. Z kolei rozstrzenie oskrzeli, czyli trwałe i nieodwracalne poszerzenie światła dróg oddechowych, naraża pacjentów na większe ryzyko wystąpienia infekcji grzybiczej dolnych dróg oddechowych [22]. Znajduje to odzwierciedlenie w mykobiomach dróg oddechowych tej grupy pacjentów. Przeprowadzone analizy w tej grupie chorych pozwoliły wykazać wyższą liczebność potencjalnie patogennych grzybów, w tym z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cryptococcus*, jak również wykazać u tych pacjentów częstsze występowanie reakcji alergicznych i silnej odpowiedzi immunologicznej związanej z pleśniami z rodzaju *Aspergillus*. Ze względu na zaburzone oczyszczanie śluzowo-rzęskowe, które jest nieodłącznie związane z rozstrzeniami oskrzeli, drogi oddechowe są podatne na grzyby obecne w bioaerozolu i proces kolonizacji [9]. W przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, pleśnie *Aspergillus* spp. były stwierdzane w oparciu o analizy metagenomiczne u 17% pacjentów, a określone gatunki grzybów, takie jak *Pneumocystis jirovecii*, wykryto również w przebiegu tej choroby u pacjentów zakażonych wirusem HIV, co wskazuje na udział predyspozycji immunologicznych w zróżnicowaniu mykobiomów tego narządu [62]. Obecność *Pneumocystis* spp. w płucach pacjentów z infekcją HIV często jest wyznacznikiem tej upośledzającej układ odpornościowy infekcji. Dodatkowo koreluje ona z wyraźnie mniejszym zróżnicowaniem mykobiomu płuc i wpływa negatywnie na utrzymanie homeostazy tego narządu [27]. Znaczna różnorodność gatunkowa w mykobiomie płuc obserwowana jest u pacjentów z mukowiscydozą, chorobą genetyczną określaną jako tzw. zwłóknienie torbielowate płuc. W tej grupie pacjentów, *A. fumigatus* był stwierdzany w płucach u 6 do 60% badanych [67]. Badania nad mykobiomem płuc u pacjentów z mukowiscydozą znajdują się w początkowej fazie i często nie jest jasne czy izolowane grzyby stanowią stabilny element mykobiomu, czy występują w płucach przejściowo [19]. Badania pacjentów z mukowiscydozą oparte o sekwencjonowanie metagenomiczne pozwalają wykryć znacznie szersze spektrum gatunków grzybów niż badania oparte o konwencjonalną hodowlę mykologiczną [19]. Stwierdzano też większą liczebność gatunków z rodzaju *Aspergillus* (zwłaszcza *A. fumigatus*) i grzybów drożdżopodobnych z takich gatunków jak *C. albicans*, *Candida parapsilosis* i *Malassezia* spp. [78]. Zarówno u pacjentów z astmą, jak i mukowiscydozą, ewentualna odpowiedź alergiczna może być wywołana obecnością *Aspergillus* spp., a w pewnych przypadkach u tych pacjentów może też prowadzić do alergicznej aspergilozy oskrzelowo-płucnej [88]. Niezależnie od rodzaju schorzenia, mykobiomy płuc poszczególnych pacjentów mogą różnić się diametralnie. Jak wykazano, korelują one ze składem gatunkowym grzybów obecnych w powietrzu zewnętrznym i wewnętrznym pomiesz-

czeń mieszkalnych, w których taka osoba przebywa [88]. Zastosowanie metod sekwencjonowania całych mykobiomów płuc zyskało w ostatnich latach znaczną popularność i zainteresowanie badaczy. Coraz częściej też, sekwencjonowanie metagenomiczne staje się nieodzowną techniką wykorzystywaną w szczegółowych analizach mykobiomów płuc pacjentów z chorobami układu oddechowego [9].

2.2. Mykobiom jelit

Wyniki badań mykobiomu jelit osób zdrowych są bardzo ograniczone. Nash i wsp. [77] zaobserwowali, że ludzki mykobiom jelitowy u osób zdrowych jest zdominowany przez grzyby drożdżopodobne, takie jak *Saccharomyces* spp., *Malassezia* spp. i *Candida* spp., aczkolwiek ze znaczną zmiennością między- i wewnątrzosobniczą. Sugeruje to, obserwowaną w czasie, dynamikę zmian w ilościowym i jakościowym składzie mykobiomu jelitowego, na którą dodatkowo ma wpływ odporność gospodarza [74, 77].

Wysiłki mające na celu zbadanie mykobiomów jelitowych koncentrowały się w dużej mierze na pacjentach z chorobami przewodu pokarmowego, a kluczowe odkrycia odzwierciedlają trendy zmian w liczebności i zróżnicowaniu gatunkowym mykobiomów w stanach chorobowych. Dla przykładu, w grupie nieswoistych zapaleń jelit badania oparte na analizie sekwencji 18S rRNA wykazały zwiększoną różnorodność gatunkową mykobiomu jelit u osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna i stosunkowo stały skład mykobiomu u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, w porównaniu z osobami zdrowymi [63]. Ponadto, określone zostały różnice między mykobiomem jelit w stanie zapalnym i bez reakcji zapalnej [63]. Zwrócono uwagę na fakt, że przeprowadzenie sekwencjonowania fragmentu ITS2 ujawniło wyraźną dysbiozę w składzie mykobiomu na tle całej populacji drobnoustrojów, w nieswoistych zapaleniach jelit, ze zwiększonym udziałem przedstawicieli *Basidiomycota* kosztem grzybów z gromady *Ascomycota*, w szczególności *C. albicans* i *S. cerevisiae* [94]. W przypadku pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, sekwencjonowanie fragmentów ITS2 potwierdziło również wzrost liczebności komponentu grzybowego podczas zaostrzeń choroby oraz wyższą częstość występowania grzybów z rodziny *Cystofilobasidiaceae* i gatunku *C. glabrata*. Natomiast przeprowadzenie sekwencjonowania fragmentów ITS1 ujawniło zwiększoną liczebność grzybów drożdżopodobnych *Candida tropicalis* w mykobiomie jelit osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna, w porównaniu ze zdrowymi osobami o wysokim stopniu pokrewieństwa [54]. Chociaż powszechnie wiadomo, że grzyby, w tym drożdżopodobne nie są czynnikami etiologicznymi tego schorzenia, gatunki takie jak *S. cerevisiae* i *Filobasidium uniguttulatum* były niejednokrotnie stwierdzane w jelitach bez towarzyszącego stanu zapalnego [64]. Nie można jednak wykluczyć, że ich obecność była przejściowa i mogła być wynikiem stosowania probiotyków zawierających w składzie mikroorganizmy, w przypadku których wykazano już pozytywny wpływ na przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna. W podgrupie pacjentów z polimorfizmami CARD9 (Caspase Recruitment Domain-containing protein 9), przejawiających wrodzoną skłonność do kandydozy, wykazano, że obecność *Malassezia restricta* może nasilać objawy choroby Leśniowskiego-Crohna. Może to sugerować, że ukierunkowanie leczenia na hamowanie wzrostu określonych gatunków grzybów może mieć znaczenie w kontekście lepszych efektów terapeutycznych u niektórych pacjentów [66]. Potwierdzają to badania Wheeler i wsp. [111], którzy udowodnili, na podstawie analiz sekwencji fragmentów ITS1, że u zwierząt doświadczalnych, którym podawano antymykotyki, występowało zaburzenie w składzie mykobiomu jelit, charakteryzujące się zmniejszeniem liczebności grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* z równoczesnym wzrostem liczebności pleśni *Aspergillus* spp., *Wallemia* spp. i *Epicoccum* spp. Powszechnie też wiadomo, że stosowanie antybiotyków wpływa na nasilenie stanów zapalnych jelit poprzez modyfikację bakteriomu jelitowego, co w konsekwencji prowadzi do preferencyjnej kolonizacji przez grzyby [95]. W tym przypadku znaczące ograniczenie populacji bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* sprzyja kolonizacji przez grzyby i w konsekwencji prowadzi do nasilenia objawów zapalenia okrężnicy [95]. Należy przy tym zaznaczyć, że te ostatnie doniesienia dotyczą doświadczeń przeprowadzonych na myszach i nie mogą być reprezentatywne dla ludzkiego mykobiomu jelita.

U pacjentów cierpiących na zespół jelita drażliwego lub przewlekłą chorobę czynnościową układu pokarmowego, analiza próbek kału, oparta na sekwencjonowaniu regionu ITS1, ujawniła dysbiozę mykobiomów jelit ze znaczną utratą różnorodności gatunkowej. Grzyby *Saccharomyces* spp. i *Candida* spp. były dominujące w mykobiomie pacjentów z zespołem jelita drażliwego i grupie kontrolnej obejmującej osoby zdrowe, z tą różnicą, że zdecydowanie wyższy odsetek grzybów z wymienionych rodzajów został odnotowany u osób chorych [49]. Przeprowadzone na modelu zwierzęcym badania nadwrażliwości trzewnej, schorzenia powiązanego z zespołem jelita drażliwego, dają podstawy, żeby sądzić, że ukierunkowana manipulacja mykobiomem jelitowym może zapewnić podstawę skutecznej interwencji terapeutycznej [18]. Do wyjaśnienia mechanistycznych podstaw tych wczesnych obserwacji potrzebne są jednak dodatkowe dowody i walidacja biologiczna [49]. Można znaleźć też doniesienia na temat istotnego zahamowania progresji guzów

nowotworowych, szczególnie w wolno postępujących gruczolakorakach przewodowych trzustki, w efekcie włączenia terapii przeciwgrzybiczej. Co ciekawe, do ponownego uaktywnienia się choroby nowotworowej doszło po zakończeniu leczenia i związanym z tym odtworzeniem populacji grzybów, głównie z rodzaju *Malassezia* [13]. Autorzy cytowanej pracy wykazali, że w wielu przypadkach progresja guza w pewnym stopniu wiąże się z aktywnością lektyny wiążącej mannozę i aktywacją kaskady dopełniacza [16]. Ponadto, zwiększona liczebność grzybów drożdżopodobnych *Malassezia* spp., z mniejszym udziałem innych grzybów takich jak *Moniliophthora* spp.*, Rhodotorula* spp., *Acremonium* spp.*, Thielaviopsis* spp. i *Pisolithus* spp., była opisywana u pacjentów z rakiem jelita grubego, podczas gdy większa liczebność grzybów z gromady *Basidiomycota* wiąże się z późnymi stadiami tej choroby [26].

Ze względu na potencjalne skutki zmian w mykobiomie jelit związane z wiekiem, ocenie poddano również biotę jelit dzieci cierpiących na nieswoiste zapalenia jelit. Uzyskane na podstawie analiz sekwencji 18S rDNA wyniki wykazały dominację grzybów z gromady *Basidiomycota* [76]. Z kolei sekwencjonowanie regionu ITS1 ujawniło w tej grupie wysoką liczebność grzybów z rodzaju *Candida,* a dodatkowo mniejszą różnorodność gatunkową mykobiomu jelit w porównaniu z dziećmi zdrowymi [23].

Mykobiom jelitowy może dodatkowo wpływać pośrednio na inne układy narządów, takie jak płuca i ośrodkowy układ nerwowy, ale dokładne mechanizmy tych zjawisk są słabo poznane. W szczególności istotna jest tu oś łącząca płuca i jelita. Dotychczasowe badania wskazują, że skład gatunkowy mikrobiomu jelitowego może być skorelowany z zapadalnością na przewlekłe zapalne choroby płuc [20]. Dla przykładu, obecność grzybów drożdżopodobnych *C. albicans* w mykobiomie jelit wpływa na szlaki odpornościowe związane z limfocytami Th17, co w konsekwencji sprzyja kolonizacji dróg oddechowych patogennymi grzybami pleśniowymi z rodzaju *Aspergillus* spp. Niewątpliwie jest to przykład wpływ składu mykobiomu jelitowego na podatność i przebieg infekcji grzybiczych układu oddechowego [14].

Dysbioza mykobiomów jelitowych była również opisywana w grupie pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi. Podobnie do powyższego, również w mykobiomach jelit pacjentów ze schizofrenią, autyzmem lub zespołem Retta stwierdzano większą liczebność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* [97]. Wyniki te skłoniły do przeprowadzenia analiz porównawczych mykobiomów jelitowych z uwzględnieniem osi mikrobiom-jelito-mózg. Należy wspomnieć, że koncepcja wpływu mikrobiomu bakteryjnego jelita poprzez odpowiednie osie jest już mocno ugruntowana [30]. Niemniej jednak, nawet dla specjalistów, związek mykobiomu jelitowego z objawami neurologicznymi, takimi jak lęk czy depresja u osób cierpiących na zespół jelita drażliwego, jest intrygujący [101]. Chociaż odkrycia te pozostają obecnie spekulatywne i wymagają dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmu biologicznego, niewątpliwie podkreślają one znaczenie i rolę grzybów zasiedlających jelita w osi mikrobiom-jelito-mózg.

2.3. Mykobiom skóry

Skóra jest kluczowym organem organizmu ludzkiego, zapewniając barierę mechaniczną, a tym samym pierwszą linię obrony przed patogenami. Jednocześnie, powszechnie wiadomo, że skóra jest główną niszą ekologiczną kolonizowaną przez grzyby [39, 44, 72–74, 82]. Skład gatunkowy mykobiomu skóry różnych osób może być bardzo różny, a istotny wpływ na jego strukturę ma wiek i płeć. Powszechnie wiadomo, że dzieci cechuje większa liczebność i różnorodność grzybów obecnych na skórze, w porównaniu do osób dorosłych, u których dominują lipofilne grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Malassezia*, co wiąże się ze zwiększoną aktywnością gruczołów łojowych nasilającą się z wiekiem dojrzewania [65]. Taki stan rzeczy u dzieci wynika więc z różnic w składzie sebum oraz niskiej aktywności gruczołów łojowych w tym wieku [60]. Niemniej jednak mykobiom skóry jest strukturą dynamiczną, a poszczególne grzyby tworzące tą populację oddziałują ze sobą i tworzą ekologiczną strukturę sieci [105].

Podobnie jak w przypadku innych układów narządów i ich mikrobiomów, dysbioza mykobiomów skóry najczęściej wiąże się z chorobami skórnymi. Powszechnie znanym faktem jest też pośredni wpływ grzybów z rodzaju *Malassezia* na indukcję i nasilanie takich jednostek chorobowych jak łojotokowe zapalenie skóry, czy AZS [65]. Odwrotnie w łuszczycy, chorobie, która związana jest z nadmiernym rogowaceniem naskórka, stwierdzano znacznie niższą liczebność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Malassezia* w porównaniu ze znacznie bogatszymi mykobiomami w przypadku osób zdrowych. Pomijając liczebność i zróżnicowanie gatunkowe mykobiomów skóry pacjentów z obu grup należy zauważyć, że grzyby z rodzaju *Malassezia* zawsze stanowiły dominujący komponent [113]. Wykazano również związek między mykobiomem skóry a chorobami ogólnoustrojowymi, które często manifestują się pewnymi zmianami skórnymi. W twardzinie układowej, mykobiom skóry pacjentów z tej grupy był zdominowany przez *Rhodotorula glutinis*, przy czym należy zaznaczyć że, aczkolwiek spójne, wyniki badań zostały uzyskane z analiz mykobiomów zaledwie czterech pacjentów chorych i czterech z grupy kontrolnej [11]. W łupieżu pstrym czynnikami etiologicznymi są niezaprzeczalnie grzyby z rodzaju *Malassezia.* Objawy chorobowe towarzyszące tej infekcji są między innymi konsekwencją apoptozy zachodzącej w melanocytach

pod wpływem działania malasezyny, przy jednoczesnej ekspozycji na promieniowanie UV [65]. W patomechanizmie tej jednostki chorobowej istotna jest też rola receptorów węglowodorów aromatycznych AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), które są w stanie modulować przebieg melanogenezy poprzez regulację ekspresji genów związanych z tym procesem [68]. Mykobiomy skóry pacjentów cierpiących na tę chorobę wykazują istotnie większą liczebność *Malassezia globosa, Malassezia sympodialis* i *Malassezia furfur*, obecnych tu głównie w formie strzępkowej w przeciwieństwie do blastokonidiów tych grzybów, powszechnie obserwowanych na zdrowej skórze [57]. W mykobiomach skóry osób zdrowych, w odróżnieniu od pacjentów z łupieżem pstrym, dominują w zależności od regionu geograficznego *Malassezia restricta*, *M. globosa* i *M. sympodialis* [51], przy czym wyraźną dominację ostatniego z wymienionych gatunków obserwowano w Polsce [56]. Ostatnio zwraca się też uwagę na znaczenie dysbiozy mykobiomu skóry, jak również odpowiedniej miejscowej terapii przeciwgrzybiczej gwarantującej przywrócenie naturalnego stanu tej swoistej niszy ekologicznej [32].

Rola mykobiomu została też opisana w kontekście łojotokowego zapalenia skóry. Grzyby *M. resticta* i *M. globosa* są identyfikowane szczególnie często u pacjentów z łojotokowym zapaleniem skóry, a zwiększenie liczebności tych gatunków w mykobiomie, w porównaniu ze skórą głowy osób zdrowych, wskazuje na początek choroby [112]. Grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą ponadto nasilać powstawanie łupieżu skóry głowy [57]. Grzyby klasyfikowane w gromadach *Ascomycota* i *Basidiomycota* są powszechne zarówno w mykobiomie skóry zdrowej, jak i dotkniętej łupieżem. W tej ostatniej, stwierdzano jednak większą liczebność grzybów z rodzaju *Acremonium, Penicillium* i *Malassezia* [57]. Atopowe zapalenie skóry może być kolejnym przykładem choroby skóry pozostającej w wyraźnym związku z mykobiomem skóry. U pacjentów z AZS obserwuje się znaczną zmienność wewnątrz- i międzyosobniczą w składzie i liczebności mykobiomów. Jednak, podobnie jak w przypadku innych chorób skóry, *M. sympodialis*, *Malassezia sloofiae* i *Malassezia dermatitis* wydają się pośrednio wpływać na przebieg tej choroby, a czasami nawet ją nasilają. U pacjentów z AZS notowane są też krążące we krwi przeciwciała IgE jako odpowiedź na antygeny grzybów drożdżopodobnych *Malassezia* spp. [51, 57, 58, 65]. Grzyby *Malassezia* spp. wchodzące w skład mykobiomu skóry mogą też wywoływać stany zapalne skóry poprzez nasilanie odpowiedzi immunologicznej związanej z limfocytami Th-17 [96]. Autorzy jednej z prac, sugerują nawet związek *Malassezia* spp. z występowaniem choroby Alzheimera. Stwierdzane u tych pacjentów stany zapalne o różnej lokalizacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz wysokie stężenia chitynaz, wskazywały na występowanie grzybów z rodzaju *Malassezia*, których obecność w tych tkankach jednoznacznie potwierdzano w oparciu o metody molekularne [74].

W badaniach mykobiomów skóry stosowano różne metody biologii molekularnej. U pacjentów z AZS zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing), jak również ukierunkowane na sekwencjonowanie różnych regionów genomu grzybów, obejmujących, m.in. sekwencje rybosomalnego RNA 28S i 18S odpowiednio z dużej i małej podjednostki, jak też sekwencje ITS1 i ITS2 [11, 51, 57, 110, 112].

2.4. Mykobiom a zaburzenia neurologiczne

Coraz więcej dowodów wskazuje na znaczenie mikrobiomu w chorobach neurologicznych. Wykazano między innymi, że zmiany w liczebności i różnorodności bakterii jelitowych są powiązane ze stwardnieniem rozsianym [6,34]. Ponadto, u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym odnotowano na podstawie analiz sekwencji nukleotydowych regionów ITS1 większą liczebność grzybów *Candida* spp., *Malassezia* spp. i *Trichosporon* spp., w porównaniu z osobami zdrowymi z grupy kontrolnej [6]. Podobnie, analizy metagenomiczne płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów ze stwardnieniem rozsianym ujawniły obecność grzybów z gromady *Ascomycota* oraz rodzajów *Malassezia* spp., *Funneliformis* spp., *Glomus* spp., *Cladosporium* spp., *Candida* spp. i *Alternaria* spp. [84]. Tego typu wyniki budzą kontrowersje, a Perlejewski i wsp. [84] sugerują, że tak duże zróżnicowanie gatunkowe prawdopodobnie odzwierciedla zanieczyszczenia środowiskowe, a nie właściwy skład mykobiomu płynu mózgowo-rdzeniowego. Z kolei, Jovel i wsp. [59] w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym nie odnotowali żadnych grzybów.

W chorobie Alzheimera komórki grzybów są wykrywane w neuronach za pomocą immunohistochemii i mikroskopii konfokalnej. Dotychczas tymi metodami zidentyfikowano grzyby z rodzajów *Candida, Cladosporium, Malassezia, Neosartorya, Phoma* i *Saccharomyces* [85]. Podaje się ponadto, że grzyby *Alternaria* spp. i *Malassezia* spp. są reprezentowane w znacznie większej liczebności u pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu z grupą kontrolną, bez jakichkolwiek dysfunkcji tkanki mózgowej [7]. W innych pracach, w tkance mózgowej osób ze stwardnieniem zanikowym bocznym wykazano zwiększoną liczebność grzybów z rodzajów *Candida, Malassezia, Fusarium, Botrytis, Trichoderma* i *Cryptococcus* [34]. Wykazany silny związek pomiędzy występowaniem łojotokowego zapalenia skóry, a chorobą Parkinsona również nasuwa podejrzenie specyficznego wkładu grzybów drożdżopodobnych *Malassezia* spp. w oba stany chorobowe. Co ważne,

udowodniono, że polimorfizmy genetyczne związane z chorobą Parkinsona i stosowanie w leczeniu lewodopy promują wzrost i inwazyjność grzybów *Malassezia* spp. Możliwy związek między składem mykobiomu skóry osób z łojotokowym zapaleniem skóry, a jednoczesnym występowaniem choroby Parkinsona może mieć znaczenie kliniczne [61]. Podsumowując, obecnie prowadzone badania wskazują, że grzyby mają pewne pośrednie znaczenie w patogenezie kilku chorób neurologicznych. Wyniki wielu badań wskazują, że obserwowane interakcje pomiędzy żywicielem a mikroorganizmem mają wpływ na stan ludzkiego zdrowia oraz na sieć komunikacyjnych osi międzynarządowych, co sprzyja rozwojowi pewnych chorób.

2.5. Mykobiom środowiskowy

Grzyby są wszechobecne i występują zarówno w środowisku naturalnym, jak i wewnątrz pomieszczeń mieszkalnych i gospodarczych. Badania naukowe wskazują, że skład gatunkowy mykobiomu środowiskowego wewnątrz budynków i w środowisku naturalnym jest zbliżony w odniesieniu do grzybów mikroskopijnych tzw. mikromycetes, aczkolwiek zwykle różny w kontekście ilościowym. Diaspory grzybowe w pomieszczeniach zamkniętych są rozmieszczone przypadkowo i zdominowane przez zarodniki, fragmenty strzępek oraz inne elementy wegetatywnych i generatywnych struktur grzybni [91]. Na skład gatunkowy mykobiomu środowiskowego wpływa lokalizacja geograficzna i związana z nią temperatura i wilgotność powietrza [50]. Mykobiom zamkniętych pomieszczeń pochodzi najczęściej z powietrza zewnętrznego, grzyby dostają się do wnętrza w wyniku wentylacji pomieszczeń. Na jego skład największy wpływ ma pula gatunków grzybów obecnych w danej lokalizacji. Inne źródła grzybów w pomieszczeniach obejmują przebywających w nich ludzi, zwierzęta domowe, rośliny, obecność instalacji wodno-kanalizacyjnych, systemów ogrzewania, wentylacji i klimatyzacji, a także resuspensję cząstek kurzu [2].

Z obecnością grzybów w pomieszczeniach zamkniętych zawsze wiążą się pewne negatywne aspekty, które jak powszechnie wiadomo są znacznie poważniejsze w skutkach, w sytuacji gdy organizmy te, znane z biodeterioracji i biodegradacji materiałów, kolonizują ściany i inne elementy budowlane w budynku. Uwalniane do atmosfery zarodniki i inne elementy grzybni, w tym alergeny i mykotoksyny, czy też lotne związki organiczne pochodzenia mikrobiologicznego (MVOC, Microbial Volatile Organic Compounds) w konsekwencji mogą nasilać objawy pewnych chorób jak astma, reumatyzm, czy też skutkować wystąpieniem syndromu chorego budynku (SBS, Sick Building Syndrome) o etiologii grzybiczej [1]. Mykobiom wewnątrz budynków, zwłaszcza mieszkalnych, jest zatem przedmiotem zainteresowania mikrobiologów, ekologów i klinicystów [1, 81]. Bazując na metodach molekularnych i sekwencjonowaniu fragmentu ITS2 wykazywano od 450 do 4400 OTU na próbę [4, 9, 81]. Wyniki tych badań wskazują, że z pomieszczeniami zamkniętymi związane są ilościowo i jakościowo bogate mykobiomy. Opisany szeroko w literaturze SBS związany jest ze złą jakością powietrza w pomieszczeniach i ekspozycją na grzyby. Występujące u mieszkańców budynku objawy najczęściej obejmują ból głowy, zawroty głowy, nudności, podrażnienie oczu, nosa lub gardła [98]. W ramach wysiłków na rzecz ograniczenia szkodliwego narażenia na mykobiom występujący w pomieszczeniach, niezbędne jest śledzenie zarodników unoszących się w powietrzu i wyeliminowanie zanieczyszczeń, które mogą stanowić ich potencjalne rezerwuary. Stanowi to istotne wyzwanie nawet w pomieszczeniach zamkniętych biorąc pod uwagę ruch aerozoli, który tu nie jest wzbudzany prądami powietrza jak to zwykle ma miejsce w środowisku zewnętrznym. Co więcej, grzyby znajdujące się na różnych powierzchniach w budynkach mogą być niewidoczne gołym okiem, a wykonywanie prób mykologicznych ze wszystkich powierzchni jest nieuzasadnione. Z tego też względu przyszłe badania zamiast koncentrować się na metodach konwencjonalnych, mogłyby uwzględniać próby śledzenia źródła poprzez zastosowanie matematycznych modeli probabilistycznych, w oparciu o dotychczasowy stan wiedzy o niszach ekologicznych grzybów [106]. Takie postępowanie mieści się jedynie w kategoriach czysto teoretycznych i nie mogłoby znaleźć zastosowania w codziennej praktyce restauratorów zabytków, czy mykologów budowlanych przeprowadzających ekspertyzy mykologiczne oraz zabiegi konserwacyjne.

Wyniki badań opartych o konwencjonalne metody hodowli ujawniają, że grzyby z rodzajów *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Rhodotorula* i *Wallemia* stanowią znaczny odsetek mykobiomu pomieszczeń cechujących się podwyższoną wilgotnością względną, takich jak toalety, gdzie szczególnie dominującym gatunkiem jest *Rhodotorula mucilaginosa*. Z kolei *A. fumigatus* na ogół dominuje jako składnik mykobiomiu pomieszczeń o niższej wilgotności względnej powietrza, takich jak pokoje dzienne, podczas gdy *Cladosporium* spp. stwierdzane były w prawie każdej przestrzeni życiowej [4, 106]. Oprócz określania różnorodności mykobiomów pomieszczeń, kolejnym obszarem aktywnych badań są prace nad materiałami budowlanymi i powłokami, które minimalizują lub zapobiegają kolonizacji przez grzyby [109]. Rozwiązania te są jednak aktualnie drogie, a dodatkowo utrzymanie sterylności w środowisku wewnętrznym pomieszczenia jest bardzo trudne lub prawie niemożliwe, stąd uzasadnione jest wyłącznie względami medycznymi,

na przykład na oddziałach intensywnej opieki medycznej, czy też w przypadku pacjentów w stanie głębokiej immunosupresji [3]. Alternatywnie, budynki powinny być konstruowane według projektów architektonicznych, które uwzględniają standardy minimalizujące liczebność mykobiomu w systemach ogrzewania, wentylacji, klimatyzacji i instalacjach hydraulicznych [98].

3. Badania nad mykobiomem w praktyce klinicznej

Liczba publikacji dotyczących mikrobiomu wzrasta wykładniczo w ostatnich latach [31, 34]. Równolegle, lepsze zrozumienie roli drobnoustrojów w zdrowiu i chorobach wzmocniło zainteresowanie badaniami mykobiomu i jego udziałem w chorobach [9, 14]. Powszechnie wiadome jest, że mikroorganizmy prokariotyczne i eukariotyczne współistnieją w tym samym środowisku i że interakcja między mikrobiomami bakteryjnymi, grzybowymi i wirusowymi prowadzi do homeostazy u zdrowych osób, podczas gdy dysbioza prowadzi do rozwoju choroby. Coraz częściej badania mykobiomu przeprowadza się u pacjentów z różnymi schorzeniami, u których możliwe jest istnienie dysbiozy w odniesieniu do danego narządu, lokalizacji anatomicznej itp. Rola mykobiomu w kontekście klinicznym cieszy się rosnącym zainteresowaniem. Pozostaje kilka wyzwań, w tym walidacja i standaryzacja metod pobierania próbek i zastosowania metod analitycznych na większą skalę [28, 81]. Obecnie nie ma znormalizowanych metod analizy mykobiomów, w tym przede wszystkim w zakresie badań genetycznych, w obszarze metod ekstrakcji DNA, doboru starterów, technik sekwencjonowania i stosowanych referencyjnych baz danych. Metodologia badań nad mykobiomami ewoluuje, co z pewnością pozwoli w przyszłości korzystać z wystandaryzowanych procedur, odpowiednio walidowanych, które dadzą gwarancję uzyskania pełnego obrazu mykobiomu pokrywającego się z rzeczywistością [13].

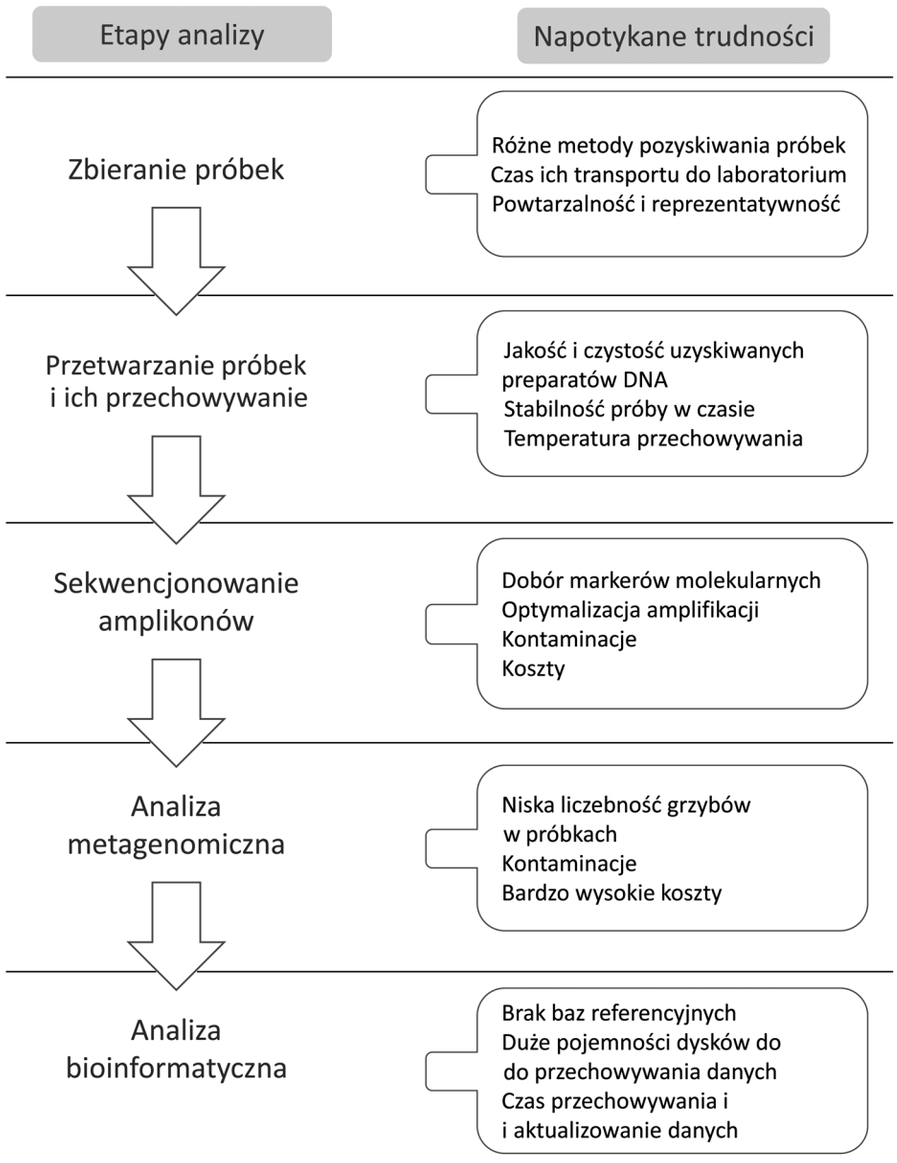
Dzięki lepszemu poznaniu specyfiki mykobiomów oraz ich interakcji z systemem odpornościowym gospodarza, a także umiejętności skorelowania tych danych z chorobą na różnych jej etapach, możliwe będzie przyspieszenie samej diagnozy i podjęcie bardziej ukierunkowanych terapii. Nowatorskie podejście i nowsze metody leczenia mogą wynikać z lepszego doboru grupy pacjentów w oparciu o profile mykobiomów, podczas gdy manipulowanie lub przywracanie „zdrowego" mykobiomu również stanowi potencjalnie i realne postępowanie medyczne [32]. Obecny postęp technologiczny w połączeniu z rosnącą ilością danych z sekwencjonowania mykobiomów, mogą w przyszłości przyczynić się do rozwoju diagnostyki „punktowej" w zakresie chorób grzybiczych [103].

4. Analiza mykobiomów: metodologia i wyzwania

Od czasu, gdy do badań nad mikrobiomami wprowadzono metagenomikę stało się możliwe uzyskiwanie pełnych obrazów populacji mikroorganizmów wchodzących w skład rozpatrywanej niszy ekologicznej, także tych niehodowalnych [102]. Detekcja tych ostatnich dotychczas nie była możliwa w oparciu o metody konwencjonalnej diagnostyki mikrobiologicznej. Metagenomika jest nową techniką polegającą na klonowaniu DNA pozyskiwanego bezpośrednio z naturalnych środowisk, w tym różnych lokalizacji anatomicznych w obrębie ludzkiego ciała i następnie sekwencjonowaniu ogromnych bibliotek genomowych. Metagenomika jest więc metodą analizy nie jednego genomu, ale puli genomów mikroorganizmów, stanowiących określony mikrobiom. Analizując poszczególne sekwencje z takiego „zbiorczego" sekwencjonowania, można ocenić genetyczną różnorodność mikroorganizmów tworzących mikrobiom danej niszy ekologicznej. Technika ta obejmuje klonowanie, sekwencjonowanie i funkcjonalną analizę genetycznego materiału, izolowanego z różnych lokalizacji anatomicznych czy innych środowisk naturalnych. Zastosowana tu technika NGS jest doskonalsza od ograniczonego, tradycyjnego sekwencjonowania [102]. Dokładne poznanie składu mikrobiomu danej niszy ekologicznej wymaga zastosowania specyficznego podejścia analitycznego do wyekstrahowanego metagenomowego DNA. W tym celu najczęściej wykorzystuje się filogenetyczny marker w postaci genu rybosomalnego RNA małej podjednostki (16S i 18S SSU rRNA, odpowiednio dla organizmów prokariotycznych i eukariotycznych), który po amplifikacji w reakcji PCR podlega klonowaniu. Pozwala to otrzymać bibliotekę reprezentującą wszystkie mikroorganizmy obecne w analizowanej niszy ekologicznej. Ostatecznie, poszczególne sklonowane fragmenty DNA są sekwencjonowane i analizowane w oparciu o narzędzia bioinformatyczne. Bardziej szczegółowe opisy postępowania w ramach poszczególnych etapów analizy metagenomicznej zostały przedstawione w dalszej części tej pracy.

4.1. Przetwarzanie próbki

Sposoby i techniki przetwarzania próbek mykologicznych, w tym technika pobrania materiału biologicznego, warunki jego przechowywania i różne protokoły ekstrakcji DNA, mogą wpłynąć na wyniki eksperymentów (Ryc. 2). Badania porównawcze różnych technik przetwarzania próbek wskazują na różną ich skuteczność, co ma implikacje dla porównań krzyżowych opublikowanych dotychczas badań nad mykobiomami. Zalecane jest zamrażanie próbek w ciągu 12 godzin od pobrania, aby zapobiec przerostowi przez szybko



Ryc 2. Metodyka analizy mykobiomów i napotykane trudności na każdym z etapów

rosnące grzyby. Istotne jest również unikanie wielu cykli zamrażania i rozmrażania próbek, aczkolwiek pojedynczy cykl zamrożenia i rozmrożenia na ogół nie obniża różnorodności taksonomicznej mykobiomu [28,81]. Obecność w ekstrahowanym metagenomowym DNA zanieczyszczeń RNA pochodzących z obecnych w próbie innych mikroorganizmów, zmniejsza udział procentowy sekwencji grzybów z niektórych taksonów, szczególnie w próbkach kału, czego efektem mogą być błędy w ocenie liczebności mykobiomów [8]. Z kolei, w takich przypadkach ocena różnorodności taksonomicznej mykobiomu (jakościowa) jest na ogół możliwa do oszacowania [77].

Podczas ekstrakcji DNA grzybowego z próbek przeznaczonych do sekwencjonowania mykobiomów, gruba i oporna na działanie licznych czynników fizyko-chemicznych ściana komórkowa grzyba, bogata w glukany, chitynę, mannany i glikoproteiny, wymaga dodatkowych procedur wstępnej degradacji, które obejmują rozbijanie mechaniczne lub lizę enzymatyczną [8, 53, 55]. Warto zauważyć, że w wielu doniesieniach naukowych liza enzymatyczna stanowi alternatywną opcję zwiększenia wydajności ekstrakcji DNA [48,107]. Uważa się ponadto, że bardziej drastyczne metody mechanicznej dezintegracji komórek mają niższą skuteczność, prawdopodobnie z powodu częściowej degradacji materiału genetycznego [90]. Różne metody ekstrakcji DNA również znacząco wpływają na wydajność i jakość uzyskiwanego DNA genomowego grzybów, a wydajność izolacji mieszaniną zawierającą fenol i chloroform często przewyższa wydajność uzyskiwaną z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów [40, 43, 71, 90]. Wspomniane straty

w stężeniu DNA obserwowane przy użyciu zestawów handlowych są prawdopodobnie związane z zastosowaniem oczyszczania na kolumnie krzemionkowej [90]. Dodatkowo, producenci zestawów do ekstrakcji DNA podają niespójne wyniki, co jest spowodowane tym, że testy wykonywane są z zastosowaniem różnych typów próbek [40, 107]. Chociaż metody ekstrakcji wpływają na ilość i jakość DNA, ostatecznie ich wpływ na skład i różnorodność mykobiomów wydaje się niewielki [55, 90]. Niemniej jednak ostatnie analizy laboratoryjne ekstrakcji DNA grzybowego z plwociny wykonane przez nasz zespół, wykazały bardziej wydajną amplifikację regionu ITS z próbek poddanych rozerwaniu mechanicznemu w porównaniu z lizą enzymatyczną. Zmienna wydajność amplifikacji została zaobserwowana pomimo efektywniejszej wydajności izolacji DNA w metodzie z zastosowaniem lizy enzymatycznej, co może sugerować lepsze uwalnianie materiału genetycznego z komórek grzyba w trakcie mechanicznej dezintegracji komórek (dane nieopublikowane). Metody ekstrakcji DNA w analizie mykobiomów są punktem krytycznym i muszą być opracowane rygorystyczne procedury, które będą następnie konsekwentnie i ostrożnie stosowane. Protokoły ekstrakcji DNA genomowego w analizie mykobiomów powinny być ponadto specyficzne dla rodzaju próbki. Istnieje zatem potrzeba standaryzowania metod w odniesieniu do konkretnego typu próbki [35, 40].

4.2. Sekwencjonowanie amplikonów

Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, technika sekwencjonowania wysokoprzepustowego (HTS, High-Throughput Sequencing) stosowana w badaniach mikrobiomu bakteryjnego nie może być bezkrytycznie przyjmowana w analizach mykobiomów [55, 80]. Autorzy cytowanych prac zwracają uwagę na istnienie szeregu pułapek i potencjalnych błędów wynikających ze stosowania techniki HTS i interpretacji uzyskanych wyników. Brak doświadczenia w praktycznym zastosowaniu tej techniki często prowadzi do zupełnie nowej interpretacji filogenetycznych zależności [79]. Z kolei wiadome jest, że sekwencjonowanie amplikonów jest ściśle uzależnione od dopasowania starterów do amplifikacji, istotne znaczenie ma więc staranne ich zaprojektowanie [16]. Kluczowe wytyczne doboru markerów do analizy mykobiomów obejmują ich rozdzielczość taksonomiczną, siłę dyskryminacyjną, wydajność amplifikacji i wielkość uzyskiwanego amplikonu [16]. Region ITS zlokalizowany pomiędzy genami kodującymi rybosomalny RNA został zaproponowany jako uniwersalny genetyczny „kod kreskowy grzybów". Z uwagi na fakt, że zawiera on zmienne sekwencje o wysokim tempie ewolucji, które otoczone są przez wysoce konserwatywne regiony obejmujące geny rRNA, służące jako odpowiednie miejsca docelowe dla uniwersalnych starterów, region ten jest jednym z kluczowych w identyfikacji gatunkowej grzybów [39, 41, 43, 42, 46, 70, 80]. Region ITS zazwyczaj posiada długość 500–700 par zasad i składa się z dwóch podregionów, ITS1 i ITS2, które są oddzielone genem o wysoce zakonserwowanej sekwencji, kodującym 5,8S rRNA [72, 71, 99]. Chociaż startery ukierunkowane na ITS były używane od dziesięcioleci w kilku projektach analizy mykobiomów na dużą skalę, do tej pory nie zostało rozstrzygnięte, który fragment ITS1 czy ITS2 jest bardziej optymalny do tego typu analiz. Ostatnie odkrycia ukazały, że fragmenty ITS nie mają wystarczającej siły dyskryminacyjnej, aby precyzyjnie identyfikować gatunki za pomocą sekwencjonowania uzyskanych z ich wykorzystaniem amplikonów [5, 33, 100]. W oparciu o te obserwacje, Nilsson i wsp. [80] przedstawili listę starterów zalecanych do amplifikacji regionu ITS i specyficznych dla różnych taksonów grzybów, które mogą być użyteczne w technice HTS i w analizach mykobiomów. Badacze Ci zalecają amplifikowanie sekwencji podregionu ITS2 za pomocą zdegenerowanych starterów gITS7ngs i gITS4ngs, ze względu na ich wysoką siłę dyskryminacyjną w identyfikacji gatunkowej grzybów. Zalety identyfikacji opartej o podregion ITS2 obejmują przede wszystkim bardziej uniwersalne miejsca przyłączenia starterów i mniejszą zmienność długości amplikonu między gatunkami grzybów, co prowadzi do mniejszej liczby błędnych rozpoznań w porównaniu z identyfikacją opartą o sekwencje podregionu ITS1 [52, 80]. Co istotne, pomimo że wspomniany zestaw starterów (gITS7ngs i gITS4ngs) ma lepszą siłę dyskryminacyjną w identyfikacji gatunkowej grzybów, rozdzielczość taksonomiczna podregionu ITS2 nie została jeszcze precyzyjnie oceniona eksperymentalnie [100]. Przed powszechnym ich wykorzystaniem konieczne są dalsze badania potwierdzające skuteczność. Ostateczny konsensus co do metodologii analiz mykobiomów, tak jak ma to miejsce w przypadku sekwencjonowania 16S rRNA mikrobiomów bakteryjnych, nie został jak dotąd osiągnięty.

Istotnym elementem jest również uzyskanie w procesie amplifikacji produktu o pełnej zakładanej długości i sekwencji pozbawionej błędów odczytu. Etap ten obejmuje staranne rozważenie liczby cykli PCR i możliwe rozcieńczenie próbek DNA do określonego wystandaryzowanego stężenia [15, 29]. Genetycy wskazują również na konieczność zredukowania liczby powstających chimer i przypadkowych błędów w powielanych sekwencjach, które kumulują się w późniejszych cyklach amplifikacji [29]. Niezbędnym wydaje się włączenie do analizy odpowiednich kontroli negatywnych i tzw. pozorowanych społeczności, czyli kultur mieszanych. Pierwsza z wymienionych wskazuje na źródła potencjalnego zanieczyszczenia, druga pozwala na ocenę powstawania chimer i poprawności wnioskowania o operacyjnych jednostkach taksonomicznych [15, 79].

4.3. Sekwencjonowanie metagenomiczne

Alternatywnym podejściem do ukierunkowanego sekwencjonowania określonych amplikonów w badaniach mykobiomów jest zastosowanie sekwencjonowania metagenomicznego (Ryc. 2). Pociąga to za sobą sekwencjonowanie całego wyekstrahowanego DNA w danej próbce bez stosowania ukierunkowanej amplifikacji regionu ITS lub innych specyficznych sekwencji docelowych. W takim podejściu, analizie podlega całkowite DNA metagenomowe wyizolowane z komórek drobnoustrojów, jak też z komórek gospodarza obecnych w próbce pobranej z analizowanej niszy ekologicznej. Odczyty sekwencji są następnie przetwarzane i klasyfikowane względem referencyjnej bazy danych [87]. Analiza zwykle obejmuje również etap usuwania sekwencji DNA gospodarza, co jest elementem krytycznym ze względu na możliwość utraty znacznej części danych, jeżeli nie podjęto próby usunięcia komórek gospodarza przed ekstrakcją DNA [75]. Sekwencjonowanie metagenomiczne powinno zapewnić lepszą, obiektywną ocenę mykobiomu. Niemniej jednak dotychczasowe badania z wykorzystaniem tej metody ujawniają niską liczebność grzybów w porównaniu z badaniami mikrobiomów bakteryjnych pochodzących z różnych typów próbek [86]. Dodatkowo tego typu analizy są kosztowne, przede wszystkim z powodu konieczności przeprowadzania bardzo precyzyjnej analizy celem wykrycia grzybów w próbkach, w których zwykle dominują bakterie [87]. Obecnie wydaje się, że właśnie niska liczebność grzybów w próbkach do analiz mykobiomów utrudnia powszechne stosowanie metagenomiki w tego typu badaniach [77].

4.4. Wyzwania bioinformatyczne

Rozwój narzędzi do analizy sekwencji fragmentu ITS jest wciąż zgłębianym obszarem badań, aczkolwiek dostępnych jest wiele opcji umożliwiających identyfikację grzybów z wykorzystaniem sekwencji tego regionu [36]. W tej dziedzinie wciąż jednak brak zgodności co do przyjętych standardów, jak też nie wypracowano zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, stąd dalsze badania normalizacyjne są zdecydowanie potrzebne (Ryc. 2). Ponadto, prawdopodobne jest, że wyniki identyfikacji uzyskiwane z analizy sekwencji fragmentu ITS w dużej mierze zależą od typu badanych próbek [93]. Na podobny problem zwraca się uwagę w przypadku analizy mikrobiomu bakteryjnego metodami ukierunkowanymi na analizę sekwencji genu 16S rRNA. W przypadku analizy mykobiomu, wysoka zmienność sekwencji regionu ITS, jeszcze bardziej komplikuje ten problem. Kolejną trudność w metagenomicznych analizach mykobiomów stanowią słabo rozwinięte bazy danych, na których opiera się identyfikacja grzybów. Prowadzi to do uzyskiwania dużej liczby niezidentyfikowanych operacyjnych jednostek taksonomicznych [10,77]. Obecnie stosowane referencyjne bazy danych sekwencji ITS obejmują INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), UNITE (https://unite.ut.ee/) i Warcup ITS [80].

W niektórych przypadkach dokładna identyfikacja na poziomie gatunku nie jest możliwa wyłącznie w oparciu o sekwencjonowanie regionów ITS [38, 39, 46]. Obecnie jednak nie są znane alternatywne markery molekularne, dla których uzyskuje się porównywalną zdolność rozdzielczą. Uważa się, że sekwencje ITS umożliwiają dokonanie identyfikacji grzybów do poziomu rodzaju, rodziny, rzędu i klasy, na podstawie stopnia podobieństwa sekwencji wynoszącego odpowiednio przynajmniej 94,3%, 88,5%, 81,2% i 80,9% [108]. Obecnie coraz większa dostępność sekwencjonowania trzeciej generacji stanowi obiecujące narzędzie analizy mykobiomów, ponieważ w genomach grzybów znajdują się długie odcinki powtarzalnego i niekodującego DNA, a także geny zawierające introny [77, 80]. W literaturze naukowej brakuje szerszych opracowań poświęconych metagenomice grzybów. Dwa kluczowe badania przeprowadzone przez Nash i wsp. [77] oraz Donovan i wsp. [31] stanowią jak dotąd najbardziej dogłębną ocenę metagenomicznej identyfikacji grzybów w próbkach ludzkich. Nash i wsp. [77] przeprowadzili obszerną ocenę wyników uzyskanych z analiz metagenomicznych, jak również uzyskanych z sekwencjonowania regionów ITS dla próbek pobranych z jelit w ramach projektu analizy ludzkiego mykobiomu. Co ważne, wykazano, że metody ekstrakcji DNA nie miały znaczącego wpływu na liczbę wykrywanych gatunków, potwierdzając małą liczebność grzybów w tych próbkach. Po drugie, wspomniani badacze wykazali, że startery swoiste dla podregionu ITS2 przejawiały większą zdolność rozdzielczą, umożliwiając identyfikację taksonów grzybów o małej liczebności w badanej próbce [77]. Z kolei Donovan i wsp. [31] przedstawili podstawy bioinformatycznej analizy metagenomów grzybów. W swojej pracy zaproponowali nowe rozwiązanie w postaci aplikacji „FindFungi", która umożliwia wykrywanie fałszywie dodatnich wyników. Dodatkowym wyzwaniem operacyjnym i logistycznym, które pozostaje jednak nierozwiązane, jest implementacja tego narzędzia bioinformatycznego do analizy mykobiomów. Korzystanie z oprogramowania „FindFungi" wymaga bowiem komputerów o wysokiej wydajności obliczeniowej ze względu na konieczność przechowywania dużych genomowych baz danych w pamięci i ich szybkiego przeszukiwania. Alternatywnym rozwiązaniem tego problemu natury czysto technicznej byłoby zastosowanie sieci komputerów, która zapewniłaby szybki przekaz informacji między tak zwanymi punktami sieci.

5. Podsumowanie

Liczba prac naukowych poświęconych mikrobiomowi i skoncentrowanych na bakteriach znacznie przewyższa liczbę publikacji na temat mykobiomów. W dużej mierze przypisuje się to pionierskim wysiłkom zmierzającym do standaryzacji metodologii sekwencjonowania i analizy bakteryjnego genu 16S rRNA. Wystandaryzowana i niezawodna metoda sekwencjonowania fragmentu ITS w analizach mykobiomów w połączeniu z bardziej kompleksową bazą danych będą miały kluczowe znaczenie dla osiągnięcia podobnego poziomu wiarygodnych analiz, jak w badaniach mikrobiomów bakteryjnych. Ponadto, pomimo znanych interakcji między różnymi grupami drobnoustrojów, badania integrujące bakteriomy, mykobiomy, wiriomy i parazytomy wciąż są ograniczone. Interakcje między drobnoustrojami z różnych grup mogą skutkować zmianą funkcji i struktury mikrobiomu jako całości, co z kolei może odgrywać istotną rolę w patogenezie danej jednostki chorobowej. Wiele gatunków drobnoustrojów wchodzi również w interakcje z elementami układu odpornościowego gospodarza, prowadząc do ogólnoustrojowych objawów choroby, wykraczających poza początkowe miejsce dysbiozy.

Dla lepszego zrozumienia roli mykobiomu i jego znaczenia w patogenezie choroby, przyszłe badania powinny zostać ukierunkowane na ocenę interakcji między przedstawicielami różnych królestw drobnoustrojów, jak również ich oddziaływań z układem immunologicznym gospodarza. Jedno jest pewne, w złożonych i wzajemnie powiązanych systemach mikrobiologicznych mykobiom jest wyraźnie rozpoznawalnym komponentem, którego dysbioza może warunkować rozwój szeregu chorób. Niemniej jednak, jeśli wiedza na jego temat zostanie odpowiednio wykorzystana, kształtowanie jego struktury, czy też dbałość o utrzymanie jego pierwotnego fizjologicznego stanu może istotnie zmienić oblicze przyszłej medycyny.

Piśmiennictwo

1. Abarenkov K., Nilsson R.H. i wsp.: Annotating public fungal ITS sequences from the built environment according to the MIxS--Built Environment standard – A report from a May 23–24, 2016 workshop (Gothenburg, Sweden). *MycoKeys* **16**, 1–15 (2016)
2. Acerbi E., Chénard C., Miller D., Gaultier N.E., Heinle C.E., Chang V.W.C., Uchida A., Drautz-Moses D.I., Schuster S.C., Lauro F.M.: Ecological succession of the microbial communities of an air-conditioning cooling coil in the tropics. *Indoor Air* **27**, 345–353 (2017)
3. Adams R.I., Bibby K.i wsp.: Ten questions concerning the microbiomes of buildings. *Build. Environ.* **109**, 224–234 (2016)
4. Adams R.I., Miletto M., Taylor J.W., Bruns T.D.: The diversity and distribution of fungi on residential surfaces. *PLoS One* **8**, e78866 (2013)
5. Ali N.A.B.M., Aogáin M. Mac, Morales R.F., Tiew P.Y., Chotirmall S.H.: Optimisation and benchmarking of targeted amplicon sequencing for mycobiome analysis of respiratory specimens. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019)
6. Alonso R., Fernández-Fernández A.M., Pisa D., Carrasco L.: Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol. Dis.* **117**, 42–61 (2018)
7. Alonso R., Pisa D., Fernández-Fernández A.M., Carrasco L.: Infection of fungi and bacteria in brain tissue from elderly persons and patients with Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 159 (2018)
8. Angebault C., Ghozlane A., Volant S., Botterel F., D'Enfert C., Bougnoux M.E.: Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols. *PLoS One* **13**, e0201174 (2018)
9. Aogáin M. Mac, Chotirmall S.H. i wsp.: Immunological corollary of the pulmonary mycobiome in bronchiectasis: The CAMEB study. *Eur. Respir. J.* **52**, (2018)
10. Mac Aogáin M., Chaturvedi V., Chotirmall S.H.: GENOMES: the new 'home' for the publication of fungal genomes. *Mycopathologia* **184**, 551–554 (2019)
11. Arron S.T., Dimon M.T., Li Z., Johnson M.E., A. Wood T., Feeney L., G. Angeles J., Lafyatis R., Whitfield M.L.: High rhodotorula sequences in skin transcriptome of patients with diffuse systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2138–2145 (2014)
12. Auchtung T.A., Fofanova T.Y., Stewart C.J., Nash A.K., Wong M.C., Gesell J.R., Auchtung J.M., Ajami N.J., Petrosino J.F.: Investigating colonization of the healthy adult gastrointestinal tract by fungi. *mSphere* **3**, (2018)
13. Aykut B., Miller G. i wsp.: The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature* **574**, 264–267 (2019)
14. Bacher P., Scheffold A. i wsp.: Human anti-fungal Th17 immunity and pathology rely on cross-reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **176**, 1340–1355.e15 (2019)
15. Bakker M.G.: A fungal mock community control for amplicon sequencing experiments. *Mol. Ecol. Resour.* **18**, 541–556 (2018)
16. Bokulich N.A., Mills D.A.: Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high--throughput profiling of fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2519–2526 (2013)
17. Bongomin F., Gago S., Oladele R.O., Denning D.W.: Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi* **3**, (2017)
18. Botschuijver S., van den Wijngaard R.M. i wsp.: Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology* **153**, 1026–1039 (2017)
19. Botterel F., Angebault C., Cabaret O., Stressmann F.A., Costa J.M., Wallet F., Wallaert B., Bruce K., Delhaes L.: Fungal and bacterial diversity of airway microbiota in adults with cystic fibrosis: concordance between conventional methods and ultra-deep sequencing, and their practical use in the clinical laboratory. *Mycopathologia* **183**, 171–183 (2018)
20. Budden K.F., Hansbro P.M. i wsp.: Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir. Med.* **7**, 907–920 (2019)
21. Casadevall A., Kontoyiannis D.P., Robert V.: On the emergence of candida auris: climate change, azoles, swamps, and birds. *MBio* **10**, e01397–19 (2019)
22. Chandrasekaran R., Mac Aogáin M., Chalmers J.D., Elborn S.J., Chotirmall S.H.: Geographic variation in the aetiology, epidemiology and microbiology of bronchiectasis. *BMC Pulm. Med.* **18**, 83 (2018)

23. Chehoud C., Albenberg L.G., Judge C., Hoffmann C., Grunberg S., Bittinger K., Baldassano R.N., Lewis J.D., Bushman F.D., Wu G.D.: Fungal signature in the gut microbiota of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1948–1956 (2015)
24. Chin V.K., Yong V.C., Chong P.P., Amin Nordin S., Basir R., Abdullah M.: Mycobiome in the gut: a multiperspective review. *Mediators Inflamm.* **2020**, 9560684 (2020)
25. Cho I., Blaser M.J.: The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 260–270 (2012)
26. Coker O.O., Nakatsu G., Dai R.Z., Wu W.K.K., Wong S.H., Ng S.C., Chan F.K.L., Sung J.J.Y., Yu J.: Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut* **68**, 654–662 (2019)
27. Cui L., Ghedin E. i wsp.: Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 932–942 (2015)
28. Cuthbertson L., Rogers G.B., Walker A.W., Oliver A., Hoffman L.R., Carroll M.P., Parkhill J., Bruce K.D., van der Gast C.J.: Implications of multiple freeze-thawing on respiratory samples for culture-independent analyses. *J. Cyst. Fibros.* **14**, 464–467 (2015)
29. D'Amore R., Ijaz U.Z., Schirmer M., Kenny J.G., Gregory R., Darby A.C., Shakya M., Podar M., Quince C., Hall N.: A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* **17**, 55 (2016)
30. Dinan T.G., Cryan J.F.: The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **46**, 77–89 (2017)
31. Donovan P.D., Gonzalez G., Higgins D.G., Butler G., Ito K.: Identification of fungi in shotgun metagenomics datasets. *PLoS One* **13**, e0192898 (2018)
32. Dyląg M., Leniak E., Gnat S., Szepietowski J., Kozubowski L.: A case of anti- pityriasis versicolor therapy that preserves healthy mycobiome. *BMC Dermatol.* in press (2020)
33. De Filippis F., Laiola M., Blaiotta G., Ercolini D.: Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00905–17 (2017)
34. Forbes J.D., Bernstein C.N., Tremlett H., Van Domselaar G., Knox N.C.: A fungal world: Could the gut mycobiome be involved in neurological disease? *Front. Microbiol.* **10**, 3249 (2019)
35. Fredricks D.N., Smith C., Meier A.: Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5122–5128 (2005)
36. Gabaldón T., Vatanshenassan M. i wsp.: Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: From PCR to NGS. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 517–547 (2019)
37. Garcia-Solache M.A., Casadevall A.: Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio* **1**, e00061–10 (2010)
38. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A.: Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. *J. Appl. Microbiol.* **129**, 212–232 (2020)
39. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M., Osińska M., Sawicki M.: Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods – a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* **130**, 278–291 (2020)
40. Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
41. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Unusual dermatomycoses caused by *Nannizzia nana*: the geophilic origin of human infections. *Infection* **48**, 429–434 (2020)
42. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Tinea corporis caused by *Trichophyton equinum* transmitted from asymptomatic dogs to two siblings. *Brazilian J. Microbiol.* **51**, 1433–1438 (2020)
43. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Molecular methods for diagnostics of dermatomycoses – review of available techniques and evaluation of their advantages and disadvantages in implementation for in routine use. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **58**, 483–494 (2019)
44. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Osińska M., Kopiński Ł.: Population differentiation, antifungal susceptibility, and host range of *Trichophyton mentagrophytes* isolates causing recalcitrant infections in humans and animals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **39**, 2099–2113 (2020)
45. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
46. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **58**, 49–58 (2019)
47. Goldman D.L., Chen Z., Shankar V., Tyberg M., Vicencio A., Burk R.: Lower airway microbiota and mycobiota in children with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 808–811.e7 (2018)
48. Goldschmidt P., Degorge S., Merabet L., Chaumeil C.: Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents. *PLoS One* **9**, e94886 (2014)
49. Gu Y., Zhou G., Qin X., Huang S., Wang B., Cao H.: The potential role of gut mycobiome in irritable bowel syndrome. *Front. Microbiol.* **10**, 1894 (2019)
50. Gusareva E.S., Schuster S.C. i wsp.: Microbial communities in the tropical air ecosystem follow a precise diel cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 23299–23308 (2019)
51. Han S.H., Cheon H.I., Hur M.S., Kim M.J., Jung W.H., Lee Y.W., Choe Y.B., Ahn K.J.: Analysis of the skin mycobiome in adult patients with atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* **27**, 366–373 (2018)
52. Heisel T., Podgorski H., Staley C.M., Knights D., Sadowsky M.J., Gale C.A.: Complementary amplicon-based genomic approaches for the study of fungal communities in humans. *PLoS One* **10**, e0116705 (2015)
53. Henderson G., Cox F., Kittelmann S., Miri V.H., Zethof M., Noel S.J., Waghorn G.C., Janssen P.H.: Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* **8**, e74787 (2013)
54. Hoarau G., Ghannoum M.A. i wsp.: Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *MBio* **7**, e01250–16 (2016)
55. Huseyin C.E., Rubio R.C., O'Sullivan O., Cotter P.D., Scanlan P.D.: The fungal frontier: A comparative analysis of methods used in the study of the human gut mycobiome. *Front. Microbiol.* **8**, 1432 (2017)
56. Jagielski T., Rup E., Ziółkowska A., Roeske K., Macura A.B., Bielecki J.: Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol.* **14**, 3 (2014)
57. Jo J.H., Kennedy E.A., Kong H.H.: Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. *Virulence* **8**, 324–333 (2017)
58. Johansson H.J., Vallhov H., Holm T., Gehrmann U., Andersson A., Johansson C., Blom H., Carroni M., Lehtiö J., Scheynius A.: Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia* sympodialis are enriched in allergens and interact with cells in human skin. *Sci. Rep.* **8**, 9182 (2018)
59. Jovel J., O'keefe S., Patterson J., Bording-Jorgensen M., Wang W., Mason A.L., Warren K.G., Wong G.K.S.: Cerebrospinal fluid in

a small cohort of patients with multiple sclerosis was generally free of microbial DNA. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 198 (2017)
60. Kalan L., Loesche M., Hodkinson B.P., Heilmann K., Ruthel G., Gardner S.E., Grice E.A.: Redefining the chronic-wound microbiome: Fungal communities are prevalent, dynamic, and associated with delayed healing. *MBio* **7**, e01058–16 (2016)
61. Laurence M., Benito-León J., Calon F.: *Malassezia* and Parkinson's disease. *Front. Neurol.* **10**, 758 (2019)
62. Lawani M.B., Morris A.: The respiratory microbiome of HIV-infected individuals. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **14**, 719–729 (2016)
63. Li Q., Wang C., Tang C., He Q., Li N., Li J.: Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **48**, 513–523 (2014)
64. Liguori G., Sokol H. i wsp.: Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients. *J. Crohn's Colitis* **10**, 296–305 (2016)
65. Limon J.J., Skalski J.H., Underhill D.M.: Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe* **22**, 156–165 (2017)
66. Limon J.J., Underhill D.M. i wsp.: *Malassezia* is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models. *Cell Host Microbe* **25**, 377-388.e6 (2019)
67. LiPuma J.J.: The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 299–323 (2010)
68. Luecke S., Backlund M., Jux B., Esser C., Krutmann J., Rannug A.: The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 828–833 (2010)
69. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A.: Mechanisms of dermatophyte resistance to antifungal substances. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **59**, 153–165 (2020)
70. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M.: Comparison of *in vitro* activities of 11 antifungal agents against *Trichophyton verrucosum* isolates associated with a variety hosts and geographical origin. *Mycoses* **63**, 294–301 (2020)
71. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health* **66**, 982–989 (2019)
72. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: Dermatophytosis with concurrent *Trichophyton verrucosum* and *T. benhamiae* in calves after long-term transport. *Vet. Dermatol.* **31**, 414–e111 (2020)
73. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **58**, 165–176 (2019)
74. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: The human microbiome. *Postep. Mikrobiol.* **56**, 33–42 (2017)
75. Marotz C.A., Sanders J.G., Zuniga C., Zaramela L.S., Knight R., Zengler K.: Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion. *Microbiome* **6**, 42 (2018)
76. Mukhopadhya I., Hansen R., Meharg C., Thomson J.M., Russell R.K., Berry S.H., El-Omar E.M., Hold G.L.: The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* **17**, 304–310 (2015)
77. Nash A.K., Petrosino J.F. i wsp.: The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome* **5**, 153 (2017)
78. Nguyen L.D.N., Viscogliosi E., Delhaes L.: The lung mycobiome: An emerging field of the human respiratory microbiome. *Front. Microbiol.* **6**, 89 (2015)
79. Nguyen N.H., Song Z., Bates S.T., Branco S., Tedersoo L., Menke J., Schilling J.S., Kennedy P.G.: FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* **20**, 241–248 (2016)
80. Nilsson R.H., Anslan S., Bahram M., Wurzbacher C., Baldrian P., Tedersoo L.: Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 95–109 (2019)
81. Nilsson R.H., Abarenkov K. i wsp.: Taxonomic annotation of public fungal ITS sequences from the built environment – A report from an April 10–11, 2017 workshop (Aberdeen, UK). *MycoKeys* **28**, 65–82 (2018)
82. Park C.O., Kupper T.S. i wsp.: Staged development of long-lived T-cell receptor αβ TH17 resident memory T-cell population to *Candida albicans* after skin infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 647–662 (2018)
83. Peay K.G., Kennedy P.G., Talbot J.M.: Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 434–447 (2016)
84. Perlejewski K., Radkowski M. i wsp.: Metagenomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **935**, 89–98 (2016)
85. Pisa D., Alonso R., Rábano A., Rodal I., Carrasco L.: Different brain regions are infected with fungi in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **5**, 15015 (2015)
86. Qin J., Wang J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010)
87. Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N.: Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* **35**, 833–844 (2017)
88. Richardson M., Bowyer P., Sabino R.: The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Med. Mycol.* **57**, S145–S154 (2019)
89. Romani L.: Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 275–288 (2011)
90. Rosenbaum J., Usyk M., Chen Z., Zolnik C.P., Jones H.E., Waldron L., Dowd J.B., Thorpe L.E., Burk R.D.: Evaluation of oral cavity DNA extraction methods on bacterial and fungal microbiota. *Sci. Rep.* **9**, 1531 (2019)
91. Seo S.C., Ji Y.G., Yoo Y., Kwon M.H., Choung J.T.: Submicron fungal fragments as another indoor biocontaminant in elementary schools. *Environ. Sci. Process. Impacts* **17**, 1164–1172 (2015)
92. Skalski J.H., Limon J.J., Sharma P., Gargus M.D., Nguyen C., Tang J., Coelho A.L., Hogaboam C.M., Crother T.R., Underhill D.M.: Expansion of commensal fungus *Wallemia mellicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. *PLoS Pathog.* **14**, e1007260 (2018)
93. Soergel D.A.W., Dey N., Knight R., Brenner S.E.: Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* **6**, 1440–1444 (2012)
94. Sokol H., Beaugerie L. i wsp.: Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* **66**, 1039–1048 (2017)
95. Sovran B., Sokol H. i wsp.: *Enterobacteriaceae* are essential for the modulation of colitis severity by fungi. *Microbiome* **6**, 152 (2018)
96. Sparber F., LeibundGut-Landmann S. i wsp.: The skin commensal yeast *Malassezia* triggers a type 17 response that coordinates anti-fungal immunity and exacerbates skin inflammation. *Cell Host Microbe* **25**, 389–403.e6 (2019)
97. Strati F., De Filippo C. i wsp.: New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* **5**, 24 (2017)
98. Straus D.C., Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A.: Studies on the role of fungi in Sick Building Syndrome. *Arch. Environ. Health* **58**, 475–478 (2003)

99. Tedersoo L., Anslan S., Bahram M., Põlme S., Riit T., Liiv I., Kõljalg U., Kisand V., Nilsson R.H., Hildebrand F., Bork P., Abarenkov K.: Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys* **10**, 1–43 (2015)
100. Tedersoo L., Lindahl B.: Fungal identification biases in microbiome projects. *Environ. Microbiol. Rep.* **8**, 774–779 (2016)
101. Thijssen A.Y., Jonkers D.M., Leue C., van der Veek P.P.J., Vidakovic-Vukic M., van Rood Y.R., Clemens C.H.M., Masclee A.A.M.: Dysfunctional cognitions, anxiety and depression in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* **44**, e236–e241 (2010)
102. Thomas T., Gilbert J., Meyer F.: Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* **2**, 3 (2012)
103. Tiew P.Y., Mac Aogain M., Ali N.A.B.M., Thng K.X., Goh K., Lau K.J.X., Chotirmall S.H.: The Mycobiome in health and disease: emerging concepts, methodologies and challenges. *Mycopathologia* **185**, 207–231 (2020)
104. Tipton L., Ghedin E., Morris A.: The lung mycobiome in the next-generation sequencing era. *Virulence* **8**, 334–341 (2017)
105. Tipton L., Müller C.L., Kurtz Z.D., Huang L., Kleerup E., Morris A., Bonneau R., Ghedin E.: Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. *Microbiome* **6**, 12 (2018)
106. Tong X., Leung M.H.Y., Wilkins D., Lee P.K.H.: City-scale distribution and dispersal routes of mycobiome in residences. *Microbiome* **5**, 131 (2017)
107. Vesty A., Biswas K., Taylor M.W., Gear K., Douglas R.G.: Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PLoS One* **12**, e0169877 (2017)
108. Vu D., Groenewald M., Verkley G.J.M. i wsp.: Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* **92**, 135–154 (2019)
109. Vučetić S.B., Rudić O.L., Markov S.L., Bera O.J., Vidaković A.M., Skapin A.S.S., Ranogajec J.G.: Antifungal efficiency assessment of the TiO2 coating on façade paints. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 11228–11237 (2014)
110. Ward T.L., Dominguez-Bello M.G., Heisel T., Al-Ghalith G., Knights D., Gale C.A.: Development of the human mycobiome over the first month of life and across body sites. *mSystems* **3**, (2018)
111. Wheeler M.L., Iliev I.D. i wsp.: Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe* **19**, 865–873 (2016)
112. Wheeler M.L., Limon J.J., Underhill D.M.: Immunity to commensal fungi: detente and disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **12**, 359–385 (2017)
113. Yan D., Issa N., Afifi L., Jeon C., Chang H.W., Liao W.: The role of the skin and gut microbiome in psoriatic disease. *Curr. Dermatol. Rep.* **6**, 94–103 (2017)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 47–58
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.05

MIESZANY BIOFILM JAMY USTNEJ

Paula Bigos*, Róża Czerwińska, Magdalena Pajączkowska, Joanna Nowicka

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski

Wpłynęło w grudniu 2020, zaakceptowano w styczniu 2021 r.

Streszczenie: Jama ustna jest skolonizowana przez ponad 700 gatunków bakterii. Występują one pod postacią pojedynczych komórek lub tworzą wielogatunkowe biofilmy. Tworzenie biofilmu, jego nieprawidłowy rozrost w połączeniu z zaburzonym funkcjonowaniem mechanizmów obronnych naszego organizmu oraz zaburzeń w składzie ilościowym i jakościowym mikrobioty jamy ustnej może prowadzić do rozwoju próchnicy, zapalenia dziąseł, parodontozy czy peri-implantitis. W pracy omówiono etapy tworzenia biofilmu oraz wzajemne oddziaływania mikroorganizmów w tej zorganizowanej społeczności. Omówiono również znaczenie wielogatunkowego biofilmu w zakażeniach jamy ustnej i co bardzo istotne, metody jego zwalczania.

1. Biofilm – definicja, etapy tworzenia, porozumiewanie się mikroorganizmów w biofilmie. 2. Biofilm w różnych częściach ciała organizmu człowieka. 3. Wielogatunkowy biofilm jamy ustnej. 4. Zakażenia jamy ustnej związane z biofilmem wielogatunkowym. 5. Zapobieganie i metody zwalczania biofilmu jamy ustnej. 5.1. Profilaktyka i właściwa higiena jamy ustnej. 5.2. Terapia alternatywna zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem biofilmu. 6. Podsumowanie

MIXED ORAL BIOFILM

Abstract: The oral cavity is colonized by more than 700 bacterial species. They occur in the form of individual cells or form multispecies biofilms. The formation of biofilm, its abnormal growth combined with impaired functioning of the defense mechanisms of the body and disorders in the quantitative and qualitative composition of the oral microbiota can lead to the development of caries, gingival inflammation, parodontosis or peri-implantitis. The paper discusses the stages of biofilm formation as well as microbial interactions within this organized community. It also addresses the significance of multispecies biofilm in oral infections and, very importantly, the methods to combat it.

1. Biofilm – definition, formation stages, microbial communication within biofilm. 2. Biofilm in different parts of the human body. 3. Multispecies oral biofilm. 4. Oral infections associated with multispecies biofilm. 5. Prevention and methods of combating oral biofilm. 5.1. Prophylaxis and proper oral hygiene. 5.2. Alternative therapy of biofilm-related oral infections. 6. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, mikroorganizmy, płytka nazębna, zakażenia
Keywords: biofilm, microorganisms, plaque, infections

1. Biofilm – definicja, etapy tworzenia, porozumiewanie się mikroorganizmów w biofilmie

Już w 1933 roku Arthur T. Henrici obserwując bakterie w środowisku wodnym, zauważył, że większość z nich to agregaty przylegające do zanurzonych w wodzie przedmiotów [34, 70]. Podobne obserwacje poczynili w 1940 r. H. Heukelekian i A. Heller [30]. Już wtedy zauważono, że bakterie tworzące trwałe struktury zaczynają wykazywać odmienne właściwości aniżeli te same drobnoustroje występujące pod postacią pojedynczych komórek [13, 70]. Warto dodać, że prawdziwą naturę biofilmu najprawdopodobniej odkrył już Antoni van Leeuwenhoek, co ciekawe, niewiele wiedząc o bakteriach [70].

Od momentu zainicjowania badań nad biofilmem widzenie tej specyficznej formy bytowania bakterii i grzybów zmieniało się. Początkowo określany jako mikroorganizmy otoczone śluzem, obecnie jako złożony organizm, zdolny do reakcji na wszystko to co dzieje się w jego otoczeniu. Najczęściej biofilm jest określany jako skupiska komórek, które związane są z powierzchnią stałą i otoczone wydzielanymi substancjami zewnątrzkomórkowymi. Bakterie i grzyby bytujące pod postacią tej zorganizowanej społeczności potrafią umiejętnie porozumiewać się między sobą, co daje możliwość szybkiej odpowiedzi na docierające z otoczenia sygnały [34, 44]. Przez długi czas sądzono, że biofilm powstaje tylko na podłożu abiotycznym lub na tkankach w ustroju gospodarza. Obecnie wiadomo, że niektóre mikroorganizmy mają zdolność tworzenia biofilmu bez udziału powierzchni stałej [34, 39].

W naturalnym środowisku bytowania ponad 99% bakterii występuje w formie biofilmu [75] i obecnie

* Autor korespondencyjny: Paula Bigos, Student Wydziału Lekarskiego, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów działające przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław: tel. 71 784 00 65; e-mail: bigospaula@gmail.com

ten „styl życia bakterii" należy uznać za główny traktując występowanie w formie pojedynczych komórek jako fazę przejściową [15]. Bakterie w biofilmie charakteryzują się znacznie większym potencjałem przetrwania [15].

Biofilmy są wszechobecne [15], znacząco wpływając na nasze zdrowie jak i przemysł [13]. Ich rozwój może przynosić zarówno korzyści jak i skutki negatywne. Wykazano ich obecność na różnych powierzchniach, w różnych środowiskach, zarówno tych naturalnych jak i stworzonych przez człowieka, w tym również w środowisku szpitalnym [13, 30]. Obecność w tym ostatnim szczególnie martwi, ponieważ wiąże się niewątpliwie z ryzykiem zakażeń szpitalnych [30]. Jest to bardzo istotne, ponieważ prawie 80% zakażeń jest związana z tworzeniem struktur biofilmu [71]. Tego rodzaju zakażenia, często o przewlekłym i nawracającym charakterze, wymagają indywidualnego podejścia. Wynika to przede wszystkim z różnic we właściwościach bakterii tworzących biofilm w porównaniu do tych samych mikroorganizmów, ale bytujących pod postacią pojedynczych komórek [70].

Z punktu klinicznego najważniejsze, cechy biofilmu to jego duża oporność na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, szczególnie na antybiotyki. Okazuje się, że drobnoustroje w formie biofilmu mogą być nawet 1000x bardziej oporne w porównaniu do ich odpowiednika w formie planktonowej (pojedyncze, rozproszone komórki) [40, 59, 71]. Poza tym z biofilmem, a dokładnie z mikroorganizmami, które go tworzą, nie radzi sobie nasz układ immunologiczny. Biofilm chroni komórki bakterii przed mechanizmami obronnymi układu immunologicznego człowieka [40] utrudniając penetrację przeciwciał w głąb jego struktur a także uniemożliwiając proces fagocytozy. Problemem jest także fakt, że dojrzały biofilm może ulegać fragmentacji a oderwane agregaty biofilmu lub pojedyncze komórki go tworzące mogą się osadzać w zupełnie nowym miejscu, często odległym od pierwotnej lokalizacji toczącego się zakażenia [59].

Większość autorów uważa, że proces tworzenia biofilmu składa się z 5 etapów [71]. Dwa pierwsze, czyli adhezja niespecyficzna i specyficzna, wydają się kluczowe. Kolejne fazy to: tworzenie mikrokolonii (akumulacja), dojrzewanie (maturacja), oderwanie komórek z dojrzałego biofilmu i ich wędrówka w poszukiwaniu nowych miejsc do zasiedlenia (dyspersja) [41, 71].

Adhezja nieswoista, inaczej „faza łączenia", to głównie interakcje fizykochemiczne jakie zachodzą pomiędzy powierzchnią abiotyczną lub tkanką a komórką drobnoustroju. Ta odwracalna faza zachodzi najczęściej w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, oddziaływań hydrofobowych lub Lewisa, wiązań van der Waalsa i napięcia powierzchniowego lub udziału sił grawitacyjnych [41].

W „fazie unieruchomienia", czyli inaczej adhezji specyficznej mają miejsce natomiast nieodwracalne, swoiste interakcje typu receptor-ligand, które zachodzą pomiędzy zewnątrzkomórkowymi strukturami bakterii (adhezyny, lektyny) a komórkowymi receptorami. W przypadku biomateriału istotnym wydaje się fakt pokrywania jego powierzchni przez warstwę białek macierzy pozakomórkowej, co ma miejsce po kontakcie biomateriału z płynami ustrojowymi i tkankami [41].

Akumulacja zachodzi dzięki proliferacji komórkowej, adhezji między komórkami drobnoustrojów i wydzielaniem przez nie zewnątrzkomórkowego śluzu. Pod wpływem śluzu bakterie zaczynają zlepiać się między sobą, w dalszym etapie śluz zaczyna pokrywać również zaadherowane komórki. Pokryte śluzem bakterie ulegają zmianom i zróżnicowaniu. Bakterie, które bytują głęboko we wnętrzu biofilmu mają ograniczony dostęp tlenu i ograniczony dostęp składników odżywczych – zaczynają u nich dominować beztlenowe szlaki metaboliczne [1, 41].

Maturacja to zmiany i zróżnicowania pomiędzy komórkami mikroorganizmów, które tworzą biofilm. Widoczne są różnice w metabolizmie tych drobnoustrojów, które znajdują się w głębszych warstwach biofilmu (metabolizm beztlenowy) w porównaniu z komórkami warstw szczytowych (metabolizm tlenowy). Biofilm staje się bardzo różnorodny pod względem aktywności komórek go tworzących: obecne są zarówno komórki martwe, komórki w stanie uśpienia, komórki o metabolizmie beztlenowym jak i komórki o metabolizmie tlenowym [59].

Kiedy biofilm staje się dojrzały i osiąga krytyczną dla siebie wielkość następuje oddzielenie i przemieszczanie się do środowiska całych jego fragmentów lub bakterii uwolnionych z jego dystalnych warstw (dyspersja). Nie do końca znane są mechanizmy jakie prowadzą do dyspersji biofilmu. Kluczowe wydają się niekorzystne dla bakterii warunki jakie panują w obrębie biofilmu – brak składników odżywczych lub utrudniony ich przepływ a także silna konkurencja – które „zmuszają" do poszukiwania bardziej korzystnych nisz [58]. Oderwane fragmenty mogą przemieszczać się np. ze strumieniem krwi i zapoczątkować infekcję w zupełnie innym, nowym miejscu. Efektem tego mogą być zakażenia narządowe i ogólnoustrojowe [10, 41, 59, 71].

Ogromną rolę w procesie tworzenia biofilmu jak i w jego funkcjonowaniu odgrywa system chemicznej komunikacji między mikroorganizmami. Fenomen porozumiewania się drobnoustrojów, istotny dla przeprowadzenia wielu procesów fizjologicznych, został odkryty w 1970 roku [5]. Quorum sensing (QS), bo o nim mowa, to zjawisko chemicznej komunikacji bakterii przy udziale cząsteczek sygnalizujących (autoinduktorów). Proces ten daje możliwość dynamicznego reagowania na zmiany zachodzące w środowi-

sku zewnętrznym a także na procesy mające miejsce we wnętrzu biofilmu. Poprzez autoinduktor mikroorganizmy w sposób kontrolowany regulują przebieg procesów fizjologicznych lub ekspresję czynników chorobotwórczości w zależności od liczebności bakterii. Kiedy bakterie osiągną właściwą liczbę, inaczej kworum, a co za tym idzie stężenie autoinduktora przekroczy wartość progową, następuje kontrolowana zmiana ekspresji genów co daje możliwość współdziałania danej populacji bakterii [59].

Warto dodać, że system quorum sensing występuje u bakterii tego samego jak i innych gatunków i daje szansę, skoordynowanej regulacji istotnych procesów życiowych w całej populacji.

2. Biofilm w różnych częściach ciała organizmu człowieka

Tak jak zaznaczono wcześniej biofilmy są wszechobecne [15] a ich rozwój może przynosić zarówno korzyści jak i skutki negatywne. Wielogatunkowy biofilm w organizmie człowieka jest tworzony przez mikrobiotę bytującą w jamie ustnej – głównie na powierzchni zębów, w jelitach, w pochwie lub na skórze [60, 68, 69].

Mikroflorę przewodu pokarmowego stanowi ponad 1000 gatunków mikroorganizmów. Komensalne wielogatunkowe drobnoustroje biofilmu jelitowego, chronią przed przewlekłymi chorobami przewodu pokarmowego, zatrzymują wodę w organizmie, stymulują odporność gospodarza, produkują witaminy (witamina K, biotyna), biorą udział w rozkładzie pokarmu. Biofilm jelit tworzą m. in. bakterie z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Streptococcus* [14, 35].

Zdolność tworzenia biofilmu jest charakterystyczna także dla bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus*. Bakterie te kolonizują jelita, pochwę i chronią przed zakażeniami przewodu pokarmowego, zakażeniami układu moczowego a także chorobami przenoszonymi drogą płciową [35]. Występujące w pochwie *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsoni* i *Lactobacillus iners*, pomagają w ochronie błony śluzowej przed patogenami, ponieważ ich metabolity (kwasy organiczne, nadtlenek wodoru, bakteriocyny) działają przeciwdrobnoustrojowo [17, 35, 63].

Biofilm jest również dominującą formą bytowania drobnoustrojów występujących na powierzchni zdrowej skóry. Do drobnoustrojów obecnych na skórze osób dorosłych możemy zaliczyć gronkowce koagulazo-ujemne, (z przewagą *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* i *Staphylococcus capitis*) bakterie z rodzaju *Corynebacterium* i *Pseudomonas* a także *Cutibacterium acnes*. Naturalna mikroflora skóry spełnia funkcję ochronną i immunomodulacyjną [60].

Biofilm został uznany za problem medyczny pod koniec lat 60. XX w. [46]. Do chorób związanych z tworzeniem biofilmu należą m.in. choroby przyzębia (będą one omówione w dalszej części pracy) a także infekcje płuc u pacjentów z mukowiscydozą. Biofilm może być obecny w ranie przewlekłej, w przewlekłych infekcjach dotyczących układu moczowo-płciowego, w chorobach otolaryngologiącznych, w infekcjach oka [2, 3, 14, 17, 21, 23, 26, 38, 46, 55, 60, 65]. Biofilm utworzony na elementach obcych, czyli biomateriałach wprowadzonych do organizmu człowieka (np. implanty stomatologiczne, cewniki naczyniowe, implanty ortopedyczne, cewniki moczowe, wewnątrzmaciczne wkładki antykoncepcyjne, implanty kardiologiczne) może prowadzić do choroby okołoimplantowej [3, 21, 46, 53].

Mukowiscydoza to rzadka choroba genetyczna spowodowana mutacją genu CFTR, który odpowiada za właściwy transport soli i wody w komórkach. W rezultacie organizm chorego wytwarza w płucach nadmiernie lepki i gęsty śluz, który zalega w oskrzelach i staje się doskonałym podłożem dla rozwoju bakterii [14]. Dominującym patogenem przewlekłego zapalenia płuc u chorych na mukowiscydozę jest *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteria ta ma doskonałe mechanizmy adaptacyjne, jest oporna na antybiotykoterapię i niestety proces leczenia nie jest w stanie wyeliminować tych pałeczek z płuc. Biofilm utworzony przez *P. aeruginosa* jest w stanie osiągnąć średnicę większą niż 100 μm [46]. Często obserwuje się koinfekcję *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* i *Candida albicans* [21]. Podczas przewlekłego zakażenia o etiologii *P. aeruginosa* następuje ciągłe niszczenie tkanki płuc, co w konsekwencji doprowadza do spadku czynności tego narządu [14].

Czynnikami etiologicznymi infekcji ran są często drobnoustroje wchodzące w skład mikrobiomu skóry. Zwykle w ranach dochodzi do zakażeń mieszanych, w których uczestniczą drobnoustroje tlenowe, jak i beztlenowe. Mieszane zakażenie również może rozwinąć się przez początkową infekcję grzybiczą, prowadzącą do pęknięć naskórka, co znacznie ułatwia bakteriom wniknięcie do głębiej położonych tkanek. Ostatecznie dochodzi do powstania trudno gojących się ran przewlekłych, często skolonizowanych przez wiele gatunków drobnoustrojów [2]. Biofilm w ranie utrudnia proces gojenia głównie poprzez zaburzone procesy immunologiczne, zakłócony mechanizm odbudowy skóry, ziarninowanie i naskórkowanie rany [2]. Do najczęściej występujących ran przewlekłych należą: odleżyny (powstające w następstwie długotrwałego ucisku, u osób unieruchomionych, leżących), owrzodzenia żylne podudzi (będące wynikiem zmniejszonego dopływu krwi do kończyn dolnych w wyniku miażdżycy) lub zespół stopy cukrzycowej [14, 23, 65].

W ranach przewlekłych biofilm może obejmować tkanki powierzchniowe, w których jako pierwszy kolonizuje *S. aureus* jak również tkanki głębokie, które preferuje *P. aeruginosa* [14, 23, 65]. Egzopolisacharyd PIA (ang. polysaccharide intracellular adhesin) wytwarzany przez gronkowca złocistego wpływa na pogorszenie stanu rany [2]. Możliwość przeżycia *P. aeruginosa* w mieszanym biofilmie zależy od jego zdolności wytwarzania piocyjaniny lub cyjanowodoru, które hamują wzrost *S. aureus*. Pałeczka ropy błękitnej podobnie antagonistycznie działa na *S. epidermidis* [2]. W ranach przewlekłych strukturę bofilmu mogą tworzyć także *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Seratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Acientobacter baumanii* a także bakterie beztlenowe *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* spp. i *Actinomyces* spp. [2, 23]. W stopie cukrzycowej *C. albicans* wspiera wzrost bakterii beztlenowych *B. fragilis* a także *Clostridium perfringens* [23].

Biofilm może również być obecny w ranie oparzeniowej. Głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń ran oparzeniowych jest *P. aeruginosa* [65]. W ranach tych często biofilm rozwija *C. albicans* oraz *S. aureus*. Warto zaznaczyć, że sterole wydzielane przez *C. albicans* przyczyniają się do wzrostu *S. aureus* w biofilmie, natomiast farnezol hamuje tworzenie biofilmu przez gronkowca złocistego.

Zakażenia układu moczowego (ZUM) związane z tworzeniem struktur biofilmu należą do przewlekłych i nawracających [17, 21, 38, 53]. Na tego rodzaju infekcje narażeni są głównie pacjenci cewnikowani [21, 53]. Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi ZUM są głównie Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wśród nich należy wymienić *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Providencia stuartii*, *K. pneumoniae*, bakterie z rodzaju *Seratia* oraz pałeczki niefermentujące *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. [21, 46]. *S. aureus* i *S. epidermidis* odpowiedzialne są za koło 50–70% infekcji związanych z tworzeniem biofilmu na cewnikach moczowych [53].

Bakteryjne zapalenie pochwy (waginoza bakteryjna) związane jest z obecnością mieszanego biofilmu na nabłonku pochwy. Najczęściej dotyczy kobiet w wieku rozrodczym. Może być przyczyną poronień, przedwczesnych porodów lub niepłodności. W zakażeniu tym dominuje *Gardnerella vaginalis* [17]. Prawdopodobnie należy ona do wczesnych gatunków kolonizujących. Inne beztlenowce takie jak *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae* i *Megasphaera* współistnieją w biofilmie jako późni kolonizatorzy. Tak jak w wyżej opisywanych infekcjach bakteryjnych tak i w przypadku waginozy bakteryjnej leczenie przynosi krótkotrwałą poprawę a w większości przypadków następuje nawrót choroby [38].

Tworzenie biofilmu może być przyczyną nawracających infekcji ucha środkowego. Za infekcje te odpowiedzialne są *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* [21]. Natomiast czynnikiem etiologicznym w przewlekłym zapaleniu błony śluzowej nosa jest *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Wszystkie te gatunki mogą tworzyć biofilm na błonach śluzowych, co utrudnia znacznie proces leczenia. Tworzenie biofilmu istotne jest również w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Dolegliwości chorobowe wywołane są przez *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* i grzyby *Candida* spp. [3].

Do przewlekłych infekcji związanych z tworzeniem biofilmu należą także infekcje oka. Występują przede wszystkim u osób noszących szkła kontaktowe [21, 26]. Bakteryjne infekcje oka obejmują zapalenie wnętrza gałki ocznej, zapalenie spojówek, zapalenie rogówki, zapalenie powiek, oczodołowe zapalenie tkanki łącznej. Mikroorganizmy odpowiedzialne za tego rodzaju infekcje należą zarówno do bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Głównymi patogenami są *S. aureus* i *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens, Moraxella* spp., *H. influenzae*, *S. pneumoniae* [26]. *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *S. marcescens* są główną przyczyną tworzenia biofilmów na powierzchni soczewek kontaktowych [21, 26].

Zakażenia okołowszczepowe są wywoływane przez drobnoustroje, które przyłączając się do powierzchni implantu żyją w postaci biofilmu. Do zakażenia dochodzi najczęściej podczas procedury implantacji a źródłem mikroorganizmów jest skóra pacjenta. Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń okołoimplantowych są gronkowce: *S. aureus* i *S. epidermidis* [58]. Leczenie tego rodzaju zakażeń często wymaga przedłużonej antybiotykoterapii i interwencji chirurgicznej. Mogą być także przyczyną wielu powikłań takich jak nieprawidłowy zrost odłamów kostnych, zapalenie skóry lub błon śluzowych a także zakażenia systemowe [58].

3. Wielogatunkowy biofilm jamy ustnej

Jama ustna dziecka tuż po urodzeniu jest wolna od mikroorganizmów. Źródłem drobnoustrojów, które z czasem zaczną kolonizować jamę ustną, jest przede wszystkim matka, ale może też być środowisko lub personel medyczny [19].

Mikrobiota jamy ustnej zmienia się w zależności od naszego wieku i tym samym stanu uzębienia. Jako pierwsze jamę ustną zasiedlają paciorkowce, często określane drobnoustrojami pionierskimi. Ich obecność stwarza dobre warunki do kolonizacji przez inne mikroorganizmy. U rocznego dziecka do głównych składników mikrobioty jamy ustnej należą paciorkowce, gronkowce, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Neisseria* oraz niektóre beztlenowce. Podczas wyrzynania zębów, kiedy pojawiają się kolejne nisze – po-

wierzchnia szkliwa i szczelina dziąsłowa – zachodzą kolejne zmiany. Paciorkowce i inne drobnoustroje preferujące tkanki twarde kolonizują szkliwo zęba, te zaś dla wzrostu których konieczne jest środowisko beztlenowe zasiedlają szczelinę dziąsłową (np. bakterie z rodzaju *Prevotella* **lub** *Porphyromonas*). Gdy wraz z wiekiem zaczynamy tracić zęby skład mikrobioty jamy ustnej jest zbliżony do tego z którym mamy do czynienia u małego dziecka jeszcze przed pojawieniem się zębów. Pojawiające się na tym etapie uzupełnienia protetyczne wpływają na zwiększenie się liczby grzybów z rodzaju *Candida* [19, 33].

Według wielu badaczy, mikrobiota jamy ustnej jest na tyle dobrze zorganizowana, że może być traktowana jak rodzaj prymitywnego organizmu wielokomórkowego. Wykazuje właściwości, których nie można przypisać pojedynczym gatunkom. Złożoność procesów zachodzących pomiędzy poszczególnymi składowymi mikrobioty jamy ustnej zapewnia wyjątkową oporność na zmiany warunków środowiska co ma istotny wpływ na utrzymanie zdrowia jamy ustnej [47].

Mikrobiotę jamy ustnej u człowieka dorosłego tworzy ponad 700 gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, zarówno tlenowych jak i beztlenowych. Bakterie kolonizują twardą powierzchnię zębów, tkanki miękkie błony śluzowej jamy ustnej, bruzdę dziąsłową, język, policzki, podniebienie i migdałki [11, 57]. Najczęstszymi bakteriami wchodzącymi w skład mikrobioty zdrowej jamy ustnej są bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Treponema*, *Lactobacterium*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacterium* i *Propionibacterium* [11]. Skład mikroorganizmów różni się u poszczególnych osób i tak jak wspomniano wcześniej także zmienia się wraz z wiekiem [66].

Na profil mikroorganizmów wpływa wiele czynników, wśród których wymienić należy m.in. reaktywność układu odpornościowego gospodarza, stan zdrowia, przebyte terapie lekami bakteriobójczymi lub bakteriostatycznymi, poziom wydzielania śliny, rodzaj stosowanej diety, położenie geograficzne, status społeczny oraz dbałość o higienę jamy ustnej [47, 50]. Przykładem naturalnego biofilmu jest płytka nazębna. Chroni ona przed patogenami wnikającymi z zewnątrz, przy prawidłowym przepływie śliny i odpowiedniej higienie jamy ustnej. Gdy te czynniki zostają zaburzone płytka nazębna rozrastając się zaburza normalny przepływ śliny co przyczynia się do kolonizacji patogennych mikroorganizmów [74].

Rozwój płytki nazębnej to wieloetapowy proces, w którym różne gatunki mają przypisane określone funkcje, umożliwiające tworzenie i rozwój rozbudowanego wielogatunkowego biofilmu [47]. Rozpoczyna się od pokrycia powierzchni zęba błonką nabytą (pellicule). Proces ten zachodzi w ciągu kilku minut po wyszczotkowaniu zębów. Błonka zawiera głównie glikoproteiny śliny (mucyna), aglutyniny, fosfoproteiny, enzymy (amylaza), oraz receptory dla adhezyn bakteryjnych [11, 18, 48, 74]. W kolejnym etapie drobnoustroje zaczynają przylegać do powierzchni błonki. „Wcześni kolonizatorzy" adherują do osłonki nabytej za pomocą specyficznych mechanizmów receptor-adhezyna. Są to głównie bakterie z rodzaju *Streptococcus, Eikenella, Streptococcus*, *Neiseria*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Prppionibacterium, Veillonella* [74]. Ten etap jest odwracalny do momentu, kiedy bakterie pionierskie, przede wszystkim *Streptococcus mutans*, zaczną wydzielać polimery białkowo-cukrowe do otoczenia. Dochodzi wówczas do adhezji nieodwracalnej, gdzie komórki bakterii przylegają ściśle do błonki nabytej i wzajemnie do siebie [74]. „Późni kolonizatorzy" rozpoznają na powierzchni bakterii pionierskich polisacharydy i białka receptorowe i przyłączają się do nich tworząc koagregaty. Zdolności takie przypisuje się bakteriom z rodzaju *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* [74]. Następuje przyrost biomasy i dojrzewanie biofilmu [11, 16, 47]. Płytka nazębna potrzebuje kilku tygodni, żeby "dojrzała", czyli ustaliła się w niej równowaga gatunkowa [51]. Wraz z dojrzewaniem biofilmu zmienia się jego skład. Zmniejsza się liczba bakterii należąca do wczesnych kolonizatorów (m.in. *Streptococcus* spp.) a zwiększa liczba późnych kolonizatorów (m.in. bakterie z rodzaju *Actinomyces* i *Corynebacterium*) [14, 57]. Z czasem biofilm ulega mineralizacji i powstaje kamień nazębny, który jest mocno związany z powierzchnią zęba a jego kryształy są podobne do tych, które tworzą szkliwo i zębinę. Tworzenie kamienia dodatkowo przyspieszane jest przez obecność obumarłych bakterii oraz metabolitów bakteryjnych. Warto zaznaczyć, że kamień sprzyja retencji płytki nazębnej oraz ma negatywny wpływ na przyzębie [20, 58].

Skład biofilmu mocno różni się w zależności od lokalizacji [36]. Czynnikami selekcyjnymi są tu m.in. dostępność składników odżywczych, niedostępność tlenu oraz tzw. przecieki koronowe śliny [20, 43]. Mikroorganizmy występujące na szczycie zęba tworzą biofilm pod- i naddziąsłowy. Płytka naddziąsłowa zdominowana jest przez paciorkowce Gram-dodatnie np. *S. mutans*, *Streptococcus salivarius* i bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Najczęściej spotyka się w niej 15 rodzajów bakterii, pośród nich m.in. bakterie z rodzaju *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* [12, 36]. Przestrzeń poddziąsłowa odcięta jest od dopływu bogatej w składniki odżywcze śliny, zamiast tego odżywiana jest przez płyn szczelinowy dziąsłowy bogaty m.in. w białka i glikoproteiny [8, 32, 36, 37]. W płytce poddziąsłowej

dominują bakterie proteolityczne i anaerobowe G (–), głównie bakterie z rodzaju *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Filifactor*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella* i *Treponema* [32].

Między drobnoustrojami tworzącymi biofilm zachodzi wiele interakcji co wpływa na gęstość bakterii w dojrzałej płytce. Są to zależności zarówno antagonistyczne jak konkurencja (o składniki pokarmowe, miejsce przyłączenia się), ale również synergistyczne, czyli kooperacja [29]. W reakcjach konkurencji biorą udział bakteriocyny, kwasy organiczne, nadtlenek wodoru a także różnego rodzaju enzymy [19, 47, 52, 74]. Przykładem oddziaływania synergistycznego jest np. komunikacja metaboliczna.

Bakteriocyny wytwarzane przez *S. mutans* i *S. salivarius*, mają działanie bakteriobójcze na szereg bakterii obecnych w jamy ustnej [37]. Innym przykładem wzajemnego oddziaływania mikroorganizmów jest synergizm między *S. mutans* i *C. albicans*. Zauważono wzmocnienie inwazyjności *C. albicans* oraz promowanie rozrostu biomasy bakteryjnej [18, 25, 29]. Wytwarzany nadtlenek wodoru przez paciorkowce, głównie *S. sanguinis* może mieć znaczenie podczas tworzenia płytki nazębnej poddziąsłowej. Obecność środka utleniającego ogranicza rozwój bakterii beztlenowych (np. *Porphyromonas gingivalis*) [37]. Synergizm między *C. albicans* i *S. mutans* może zwiększać zjadliwość mieszanych biofilmów tworzących się na powierzchni zębów, przy czym *S. mutans* ma hamujący wpływ na filamentacje *C. albicans* w biofilmach mieszanych [5].

Paciorkowce jamy ustnej pośredniczą w adhezji do tkanek jamy ustnej, jak również do innych bakterii i grzybów. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis, Streptococcus oralis* i *Streptococcus sanguinis*, mogą bezpośrednio oddziaływać z *C. albicans*. Wykazano, że *S. oralis* i *C. albicans* razem tworzą silniejsze biofilmy, niż każdy z tych mikroorganizmów osobno. Koinfekcja *S. oralis* i *C. albicans* prowadzi do wzmożonej inwazji tkanek błony śluzowej. Może to być wynikiem uwolnienia kalpainy, degradujacej połączenia E-kadheryn w komórkach nabłonka, umożliwiając dostęp do nabłonka zarówno komórkom grzybów jak i bakterii. *S. oralis* jest również zdolny do indukowania filamentacji *C. albicans*. *S. gordonii* może wiązać się bezpośrednio z *P. gingivalis* i komunikować się z nim za pośrednictwem wydzielanych czynników, nasilając jego patogenne działanie prowadzące do chorób przyzębia. *S. gordonii* bierze udział w silnej interakcji koagregacyjnej z *Actinomyces oris* [50].

Wraz z różnymi gatunkami paciorkowców *Actinomyces* spp. należą do pierwszych kolonizatorów powierzchni i tkanek jamy ustnej. *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus* i *Actinomyces oris* współagregują z *C. albicans*. Wykazano, że niektóre metabolity wytwarzane przez *A. naeslundii* i *A. viscosus* i wydzielane w dużych stężeniach hamują wzrost *C. albicans*. Gdy stężenie metabolitów jest mniejsze zaobserwowano pobudzenie wzrostu grzybów z rodzaju *Candida*. *Actinomyces* spp. mogą także koagregować z paciorkowcami jamy ustnej, głównie z *S. oralis*. Wskazuje to na możliwość współdziałania *C. albicans* zarówno z *S. oralis,* jak i z bakteriami z rodzaju *Actinomyces*.

Wykazano, że *Fusobactreium nucleatum* hamuje tworzenie strzępek u grzybów z rodzaju *Candida*. Grzyby natomiast osłabiają odpowiedź makrofagów indukowanych przez *F. nucleatum*. To wzajemne osłabienie zjadliwości może przynieść korzyści obu mikroorganizmom – długoterminowy komensalizmowi w jamie ustnej. Trzeba zaznaczyć, że *F. nucleatum* koagreguje z prawie wszystkimi innymi bakteriami jamy ustnej.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, główny czynnik etiologiczny przewlekłego zapalenia przyzębia może hamować tworzenie strzępek u *C. albicans*. *C. albicans* natomiast zwiększa inwazję *P. gingivalis* odpowiedzialnego za choroby przyzębia [50].

W biofilmie mieszanym wytwarzane przez mikroorganizmy (głównie paciorkowce) metabolity pomagają innym gatunkom czerpać energię potrzebną do wzrostu. Kwas mlekowy będący produktem przemiany materii paciorkowców i pałeczek kwasu mlekowego, jest głównym źródłem energii dla *A. actinomycetemcomitans* i *Veillonellae* [37].

Wiele interakcji międzygatunkowych między bakteriami jamy ustnej prowadzi do zmian w ekspresji genów w jednym lub obu organizmach partnerskich. W przypadku interakcji między *Veillonellae* a paciorkowcami, regulacja genów najwyraźniej wpływa na magazynowanie węglowodanów przez paciorkowce [37].

4. Zakażenia jamy ustnej związane z biofilmem wielogatunkowym

Jeśli biofilm się rozwinie, może się nieprawidłowo rozrastać i powodować zakażenia. W sprzyjających warunkach istnieje ryzyko rozwinięcia zapalenia dziąseł, parodontozy, peri-implantitis. Zakażenia jamy ustnej mogą także szerzyć się drogą krwiopochodną i powodować zakażenia ogólnoustrojowe [43].

W wyniku nadmiernego spożycia węglowodanów, niedostatecznej higieny jamy ustnej oraz spadku przepływu śliny dochodzi do rozwoju zmian próchniczych. Węglowodany fermentują do kwasów organicznych, co zapewnia zakwaszenie mikrośrodowiska, a w konsekwencji przewagę gatunków kwasotwórczych i kwasoopornych w biofilmie przy spadku ogólnej różnorodności gatunkowej. Organizmy kwasotwórcze i kwasooporne posiadają zdolność budowania pozakomórkowych polisacharydów z cukrów dostarczanych

z pożywieniem. Biorą one udział w tworzeniu macierzy międzykomórkowej biofilmu, zapewniają ustabilizowanie płytki na powierzchni zęba lub są zapasowymi substancjami wykorzystywanymi do pozyskiwania energii w przypadku ograniczonego dostępu do cukrów [43, 64]. Za główne bakterie próchnicotwórcze uważa się: *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium dentium*, *Scardovia wiggsiae*. Nowe doniesienia mówią także o udziale w zmianach próchniczych bakterii z rodzaju *Schlegelella* oraz *Pseudoramibacter*. Należy zaznaczyć, że sama obecność wymienionych gatunków nie jest równoznaczna z wystąpieniem zmian próchniczych, ponadto próchnica może wystąpić bez udziału każdego z nich. Nadrzędne znaczenie ma zaburzenie homeostazy biofilmu nazębnego na korzyść bakterii kwasotwórczych [43]. Nieleczona próchnica może powodować penetrację bakterii związanych z biofilmem w głąb zęba, powodując w konsekwencji zapalenie miazgi zębowej, która może doprowadzić do martwicy zęba [7, 19, 43, 64].

Biofilm kanałów korzeniowych w warunkach fizjologicznych jest zdominowany przez bakterie tlenowe i fakultatywne beztlenowce. W wyniku zmian pH lub niedostatecznej ilości tlenu w kanale korzeniowym dochodzi do zmiany fenotypu biofilmu, z przewagą bakterii bezwzględnie beztlenowych oraz do rozwoju zakażeń, w tym parodontozy [24, 43, 52]. Za zakażenia te odpowiadają głównie bakterie z rodzajów: *Bacteroides* spp., *Prophyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Treponema* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., i *Campylobacter* spp. W niektórych przypadkach może dojść do przedostania się bakterii z ognisk zakażenia w kanałach korzeniowych do fizjologicznie jałowej miazgi zębowej, powodując jej zapalenie. W wyniku niepowodzenia leczenia endodontycznego, nieleczonej próchnicy lub przetrwałego zakażenia tkanek okołowierzchołkowych mogą rozwinąć się zakażenia wtórne kanałów korzeniowych oraz miazgi, a profil bakteryjny tych zakażeń jest różny w zależności od przyczyny pierwotnej [19, 43, 52]. Kiedy infekcja występuje wskutek postępującej próchnicy, w początkowych etapach zakażenia biorą głównie udział bakterie próchnicotwórcze. Z czasem, z powodu niedostatecznej ilości tlenu, tlenowe bakterie próchnicotwórcze zostaną wyparte przez bakterie bezwzględnie beztlenowe. Flora bakteryjna kanałów korzeniowych znacznie zmienia się pod wpływem leczenia kanałowego. Główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu endodontycznym jest przeciek koronowy. Do jego powstania może doprowadzić złamanie odbudowy zęba, nieszczelne wypełnienie lub korona. Przeciek koronowy umożliwia dostarczenie substancji odżywczych, co pomaga odżyć uśpionym organizmom w niewypełnionych przestrzeniach kanałów. „Wprowadza" również nowe organizmy. W ten sposób można także tłumaczyć nawrót zapalenia po leczeniu endodontycznym [24]. Bakterie wywołujące zakażenia wtórne charakteryzują się wysoką tolerancją na szeroki zakres pH oraz niedobór substancji odżywczych. Bakteriami dominującymi są w tym przypadku bakterie z rodzajów: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* oraz grzyby, zwłaszcza *Candida* spp. [52].

Kumulacja płytki nazębnej w okolicy dziąseł prowadzi do zapalenia dziąseł i zwiększonej ilości komórek zapalnych, nasilających odpowiedź immunologiczną gospodarza, doprowadzając w konsekwencji do destrukcji tkanek przyzębia. Mikroorganizmy, które są związane ze schorzeniami przyzębia, wykorzystują białka oraz glikoproteiny gospodarza do celów odżywczych. Są to Gram (–) bakterie beztlenowe: *P. gingivalis, Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *A. actinomycetemcomitans, Prevotella* spp., *F. nucleatum* [43, 64]. W tym przypadku dochodzi do wzrostu ogólnej różnorodności gatunkowej biofilmu [64]. Choroba objawia się bólem, krwawieniem i obrzękiem dziąseł. Jest ona w pełni odwracalna poprzez usunięcie biofilmu z powierzchni zęba oraz utrzymanie odpowiedniej higieny jamy ustnej. Postępująca choroba oraz nasilenie odpowiedzi immunologicznej powodują uszkodzenie tkanek głębszych, w tym więzadeł przyzębia. Rozwija się parodontoza, dochodzi do tworzenia się kieszeni dziąseł i przyzębia oraz wypadania zębów. Leczenie polega na wszczepieniu implantów zębów [7, 43].

Implanty są bardziej podatne na powstawanie biofilmu na ich powierzchni niż zęby naturalne. U wielu pacjentów rozwija się zapalenie tkanek okołoimplantowych, tzw. peri-implantitis, które może być wczesne lub późne. Peri-implantitis wczesne jest spowodowane nieprawidłową osteointegracją implantów, co może być skutkiem użycia wadliwego materiału, zakażenia śródoperacyjnego, nieskutecznego gojenia wskutek zakażenia systemowego. Peri-implantitis późne natomiast jest to zaburzenie funkcji prawidłowo zaimplantowanego implantu, towarzyszy mu przewlekłe zakażenie tkanek otaczających. Odpowiednikiem zapalenia dziąsła w odniesieniu do tkanek okołoimplantowych jest tzw. peri-implant mucositis, gdzie stan zapalny dotyczy wyłącznie tkanek miękkich, nie kości. Rozwój zakażenia może prowadzić do stopniowej destrukcji kości – peri-implantitis – odpowiednik parodontozy [7, 43]. Zakażenia związane z implantami zębowymi dotyczą 5–8% pacjentów i są powodowane w większości przez: *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Peptostreptococcus micros*, *Bacteroides forsythus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis, Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *T. denticola*, *Prevotella intermedia*, *T. forsytha, F. nucleatum*, *Prevotella nicrescens*, *Bacteroides* spp.

Ze względu na obfite unaczynienie dziąseł bakterie powodujące zakażenia jamy ustnej często dostają się do krwiobiegu. Bakteriemia może wystąpić na skutek agresywnego szczotkowania zębów, urazu twarzoczaszki,

powikłania parodontozy lub zabiegów dentystycznych. Zazwyczaj bakterie są eliminowane z krwiobiegu w przeciągu 30 minut i nie powodują problemów zdrowotnych. Czasami, zwłaszcza u pacjentów z grupy ryzyka, dochodzi jednak do rozwoju zakażeń innych narządów. Najpoważniejszym z nich jest bakteryjne zapalenie wsierdzia, gdzie *Streptococci z gr. orale* są jednym z najczęstszych czynników etiologicznych tego rodzaju zakażeń [46]. Bakterie powodują uszkodzenie mięśnia sercowego a także elementów sztucznych (sztuczne zastawki aortalne, mitralne, urządzenia wewnątrzsercowe) [28, 65]. Skutkiem zapalenia wsierdzia może być niewydolność serca oraz zatorowość naczyniowo-mózgowa [28]. Ponadto zanotowano zapalenia układu oddechowego, pokarmowego i mózgu [43].

Na uwagę zasługują wzajemne oddziaływanie grzybów i bakterii tworzących biofilm jamy ustnej oraz rola tych relacji w rozwoju zakażeń. W badaniach wykazano, że *C. albicans* i *Streptococcus* spp. wzajemnie zwiększają swoją wirulencję. Prowadzą do rozwoju kandydozy jamy ustnej, próchnicy wczesno dziecięcej, peri-implantitis. W przypadku próchnicy wczesno dziecięcej, obecność *C. albicans* oraz sacharozy synergistycznie zwiększa wirulencję *S. mutans*, w krótkim czasie doprowadzając do rozległych zmian próchniczych [20]. Zależności te są przedmiotem dalszych badań i obserwacji.

Istnieją także zakażenia związane z tworzeniem biofilmu wyłącznie przez grzyby. Przewlekła kandydoza rumieniowa dotyczy nawet 60% pacjentów stosujących protezy zębowe i jest związana z biofilmem tworzonym przez grzyby z rodzaju *Candida*. Ogniska zapalne tworzą się na błonie śluzowej podniebienia, w pobliżu powierzchni protezy. Czynnikami predysponującymi do rozwoju zakażenia są m.in.: nieprawidłowa higiena jamy ustnej, cukrzyca, upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego [51].

5. Zapobieganie i metody zwalczania biofilmu jamy ustnej

5.1. Profilaktyka i właściwa higiena jamy ustnej

Terapia zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem biofilmu stanowi wyzwanie dla współczesnej stomatologii. Nadrzędne znaczenie ma więc zapobieganie tego rodzaju zakażeniom, głównie poprzez ograniczenie powstawania biofilmu. Podstawową formą profilaktyki jest przede wszystkim właściwa higiena jamy ustnej, polegająca na regularnym oczyszczaniu zębów, ich uzupełnień oraz aparatów ortodontycznych za pomocą szczotki i pasty do zębów, nici dentystycznych oraz środków do płukania jamy ustnej. Zarówno szczoteczka jak i pasta do zębów powinny być dobrane, do indywidualnych potrzeb pacjenta. Pomocne w tym będzie zbadanie stanu uzębienia oraz zebranie odpowiedniego wywiadu przez stomatologa lub higienistę stomatologiczną [74]. Należy także pamiętać o oczyszczaniu przestrzeni międzyzębowych za pomocą nici dentystycznych, szczoteczek międzyzębowych lub szczoteczek jednopęczkowych.

W prewencji próchnicy należy wybierać pasty do zębów oraz płyny do płukania jamy ustnej, które zawierają środki o działaniu przeciwbakteryjnych. Są to fluor, chlorheksydyna, trikloksan, fluorek cyny (II), sangwinaryna oraz sole cynku [9, 31, 74].

Nie bez znaczenia pozostaje dieta pacjenta, szczególnie ilość spożytych cukrów. Należy ograniczyć spożycie cukrów przed snem oraz między posiłkami, a ich dzienna dawka nie powinna przekraczać 40–55 g [31].

Powszechnym problemem stomatologicznym jest także rozwijanie się próchnicy wtórnej na skutek kumulowania się biofilmu w mikroszczelinach pomiędzy wypełnieniem pierwotnego ubytku a zdrowym zębem. Ponadto powierzchnia materiału stomatologicznego, ze względu ma swoją chropowatość bardziej sprzyja odkładaniu się na niej biofilmu niż na powierzchni zdrowego szkliwa. [19] Z tego powodu dodano do materiałów dentystycznych substancje, które zawierają związki fluoru lub absorbują je z otoczenia, aby przy spadku pH je uwalniać, gwarantując działanie bakteriostatyczne. Przykładami takich związków są: giomery, cementy glass-jonomerowe, kompomery [19].

Często jednak dostępne metody zapobiegania tworzenia biofilmu nie są wystarczające, aby całkowicie wyeliminować ryzyko rozwoju zakażenia.

5.2. Terapia alternatywna zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem biofilmu

Ogromnym zróżnicowaniem, pod względem aktywności metabolicznej, komórek tworzących biofilm, tłumaczy się jego oporność na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przede wszystkim na antybiotyki [74]. Antybiotyk, działający na komórki szczytowych warstw biofilmu, nie będzie działał na te położone głębiej. Często do głębszych warstw biofilmu antybiotyk dociera w stężeniach sub-inhibicyjnych co uniemożliwia inaktywację drobnoustrojów, co gorsza, prowadzi do selekcji szczepów opornych. Poza tym komórki bytujące w stanie uśpienia w sposób powolny, stopniowy nabywają oporność na dany antybiotyk [74].

Bakterie występujące w postaci biofilmu wykazują zwiększoną oporność oraz tolerancję na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, głównie antybiotyki. Wykazano, że stężenie antybiotyku niezbędne do likwidacji bakterii żyjących w biofilmie musi być co najmniej kilkaset, a nawet tysiąc razy wyższe od stężenia tego samego antybiotyku działającego na formy planktoniczne danych bakterii [74].

Nieskuteczność antybiotykoterapii jest spowodowana głównie przez obecność osłonki cukrowo-białkowej, która utrudnia penetrację substancji przeciwbakteryjnej w głąb biofilmu. Poza tym, bakterie wewnątrz biofilmu ze względu na ograniczony dostęp tlenu zwalniają procesy metaboliczne, co warunkuje nieskuteczność preparatów bakteriobójczych, które działają jedynie na komórki w stanie podziału lub aktywne metabolicznie [74]. Poprawa kliniczna jest więc wynikiem oddziaływania tylko na bakterie występujące na powierzchni biofilmu, co zmniejsza rozległość biofilmu, jednak nie eliminuje go do końca. Co więcej, zabite komórki mogą stać się źródłem pokarmu dla organizmów przetrwałych i prowadzić do powrotu struktury do wielkości pierwotnych nawet w ciągu kilku-kilkunastu godzin [49, 74]. Inna teoria mówi, że poprzez „bliski" ze sobą kontakt komórek tworzących biofilm „zasięg" powierzchni komórki, na którą będzie działać antybiotyk, jest mniejszy niż w przypadku komórek planktonowych [6]. Z niewielkiej odległości między komórkami tworzącymi biofilm oraz dużego ich zagęszczenia, na stosunkowo niewielkiej powierzchni wynika łatwość nabywania mechanizmów oporności przez komórki wrażliwe. Nierzadko, w przypadku biofilmów mieszanych, mamy do czynienia z horyzontalnym transferem genów [22]. Coraz częściej porusza się temat obecności komórek przetrwałych (persister cells) w biofilmie i ich roli w jego oporności. Komórki te, o wysokim poziomie tolerancji na różne związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, występują głównie w miejscach o nieodpowiedniej dostępności składników odżywczych w biofilmie. Ograniczony wzrost tych komórek i ich duża oporność są przyczyną odnowy biofilmu po zastosowanej u pacjenta antybiotykoterapii co może skutkować nawracającymi, przewlekłymi zakażeniami [27]. Nieskuteczność antybiotykoterapii zmusza naukowców do poszukiwania innych, alternatywnych metod zwalczania biofilmu.

Coraz bardziej powszechne w gabinetach stomatologicznych staje się zastosowanie nanocząsteczek niektórych metali [19, 42, 74]. Ze względu na niewielkie rozmiary oraz możliwość modyfikacji ich struktury są one z powodzeniem wykorzystywane jako transportery leków do trudno dostępnych miejsc [42, 74]. Ponadto wykazano właściwości antybakteryjne niektórych nanocząsteczek metali, a zwłaszcza dwutlenku tytanu (IV) (TiO2NPs) oraz srebra (AgNPs) [19, 42, 74]. TiO2NPs powoduje śmierć komórek bakteryjnych poprzez destabilizację ich błony komórkowej, jednak tylko w obecności promieni UV [30]. AgNPs natomiast oprócz właściwości bakteriobójczych posiadają również właściwości grzybo- i wirusobójcze [19]. Nanocząsteczki srebra reagują z grupami tiolowymi [-sh] błon komórkowych bakterii, zmieniając ich przepuszczalność oraz blokując łańcuch oddechowy [19, 74]. Dochodzi do zahamowania procesów oddechowych a także kumulacji we wnętrzu komórki produktów przemiany materii, co w konsekwencji prowadzi do inhibicji produkcji białek i śmierci komórki [19, 74]. Nanosrebro jest szczególnie aktywne wobec *Enterococcus faecalis*, głównej bakterii odpowiedzialnej za rozwój próchnicy wtórnej [19, 42]. Dodanie AgNPs do systemów wiążących wypełnienia endodontyczne z tkankami zęba, zapewnia eliminację drobnoustrojów pozostałych w ubytku oraz zwalczanie biofilmu powstającego w mikroszczelinach pomiędzy wypełnieniem a tkanką zęba, co zapobiega rozwojowi próchnicy wtórnej [19, 42]. Wykazano, że największą skuteczność przeciwdrobnoustrojową uzyskuje się poprzez zastosowanie nanosrebra w postaci 0,02% żelu [42], który gwarantuje przy okazji lepszą adhezję wypełnienia do zęba, a tym samym jego większą trwałość [19].

Innowacyjną terapią w medycynie i stomatologii jest terapia bakteriofagami. Wysoka swoistość bakteriofagów wobec bakterii chorobotwórczych, pozwala na selektywną eliminację bakterii bez wpływu na naturalną mikrobiotę pacjenta [54, 67, 74]. Fagi wykorzystywane w celach terapeutycznych powinny wykazywać cykl lityczny, szybko namnażać się w zainfekowanych komórkach oraz prowadzić do ich lizy z uwolnieniem dużej ilości kopii wirusa [66]. Doprowadzają do śmierci komórek bakteryjnych za pomocą enzymów – lizyn oraz depolimerazy polisacharydów. Ponieważ biofilm bakteryjny składa się z wielu gatunków bakterii, można łączyć bakteriofagi z innymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi w celu zwiększenia efektywności leczenia. Alternatywną metodą jest rekombinacja genetyczna fagów, polegająca na wszczepieniu do ich genomu genu określonego enzymu, mającego właściwości przeciwbiofilmowe [54, 67, 74].

Kluczową rolę w formowaniu się biofilmu oraz jego adhezji do powierzchni zębowych odgrywają zewnątrzkomórkowe glukany, wytwarzane przez paciorkowce bytujące w jamie ustnej [54, 73]. Glukany można podzielić na rozpuszczalne w wodzie dekstrany (alfa-1,6-glukany) oraz nierozpuszczalne w wodzie mutany (głównie alfa-1,3-glukany) [73]. Mutany powodują absorpcję paciorkowców do powierzchni zęba, ich agregację, a także stabilizację płytki nazębnej [54, 73]. Dekstrany natomiast stanowią rezerwę cukru w przypadku jego niedoboru dla optymalnego rozwoju bakterii [73]. Wykonano obiecujące próby rozkładu mutanu, z użyciem enzymów glukanolitycznych i tym samym destabilizacji i usunięcia biofilmu. Zespół polskich naukowców przeprowadził udaną próbę eliminacji mutanu oraz biofilmu na modelu protezy za pomocą mieszaniny 3 enzymów w niewielkich stężeniach- dekstranazy, endomutazy oraz egzomutazy [73]. Opisano również badanie wykonane przez japońskich naukowców, którzy metodami inżynierii genetycznej, skonstruowali chimeryczną

glukanazę, łącząc geny kodujące dekstaranazę i mutanazę, pochodzące z różnych gatunków bakterii. Wyniki ukazały 4,1 razy wyższą skuteczność produktu rekombinowanego genu od mieszaniny enzymów [54].

Alternatywną metodą zwalczania biofilmu jest zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Substancje te wykazują aktywność zarówno wobec bakterii Gram (+) jaki i Gram (–), w tym wielolekoopornych, a także wobec grzybów. Mechanizm działania większości peptydów polega na zmianach w przepuszczalności błony komórkowej patogenu, doprowadzając w konsekwencji do jego śmierci [72]. Do naturalnych peptydów, których skuteczność działania została wykazana w badaniach [4], należy ε-Poli-L-lizyna oraz nizyna [72]. Badania udowadniają skuteczność obu peptydów w zwalczaniu *S. mutans* in vitro [4]. Obecnie prowadzonych jest wiele prób modyfikacji enzymów naturalnych, aby zoptymalizować ich działanie przeciwbiofilmowe [72]. Jednym z tak powstałych enzymów jest specyficzny peptyd D-enancjomeryczny (DJK-5). Udokumentowano skuteczność DJK-5 wobec eliminacji biofilmu o etiologii *S. mutans* i *E. faecalis*, a także prewencji jego ponownego formowania przez 72 h [76]. Najlepsze rezultaty otrzymano po połączeniu DJK-5 z chlorheksydyną. W innych badaniach wykazano aktywność peptydów hybrydowych, powstałych z określonych fragmentów cekropiryny A oraz melityny [76], zarówno wobec wieloopornych szczepów *Acinetobacter baumanii* [62] jak i *C. albicans* [56].

Terapia fotodynamiczna (PDI) polega na zastosowaniu tzw. fotouczulaczy, czyli nieaktywnych barwników i traktowanie ich światłem o określonej długości fali w obecności tlenu. W wyniku tego powstaje tlen singletowy oraz wolne rodniki, które uszkadzają komórki tworzące biofilm [61]. W badaniach wykazano efektywność Photofrinu aktywowanego światłem laserowym o długości fali 630 nm w obniżeniu żywotności biofilmów *S. mutans* [45]. W innych badaniach szczególnie skuteczne działanie wobec biofilmu *S. mutans* wykazano przy naświetlaniu erytrozyny światłem białym w zakresie fal 500–650 nm. Ponadto zaobserwowano, że im biofilm był bardziej dojrzały tym efektywność PDI była większa, niezależnie od zastosowanego barwnika. Może to oznaczać, że fotouczulacze lepiej przenikają do rozluźnionej struktury biofilmu [61].

6. Podsumowanie

W naturalnym środowisku bytowania ponad 99% bakterii występuje w formie biofilmu [75]. Dotyczy to również mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobioty naszego organizmu, szczególnie jamy ustnej. Nieprawidłowy rozrost biofilmu może prowadzić do zapalenia dziąseł, parodontozy lub periimplantitis.

Terapia zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem struktur biofilmu stanowi wyzwanie dla współczesnej stomatologii. Nadrzędne znaczenie ma więc zapobieganie tego rodzaju zakażeniom, głównie poprzez ograniczenie powstawania biofilmu.

Znajomość metod profilaktyki, ale także skutecznego usuwania biofilmu są w tym względzie bardzo istotne.

Piśmiennictwo

1. Achinas S., Charalampogiannis N., Euverink G.J.W.: A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Appl. Sci.* **9**, DOI:10.3390/app9142801 (2019)
2. Ahmed A., Boateng J.: Treatment of Mixed Infections in Wounds (in) Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications, ed. Boateng J., John Wiley&Sons, 2020, p.91–113
3. Altin F., Yasar H., Desrosiers M.: Superantigens and Biofilms in Sinus Diseases (in) All Around the Nose, ed. Cingi C., Bayar Muluk N., Springer, Cham, 2020, p.179–186
4. Badaoui Najjar M., Kashtanov D., Chikindas M.L.: Natural antimicrobials ε-Poly-L-lysine and Nisin A for control of oral microflora. *Probiotics Antimicro.* **1**, 143–147 (2009)
5. Barbosa J.O., Rossoni R.D., Vilela S.F.G., de Alvarenga J.A., Velloso Md.S., Prata M.C.dA., Jorge A.O., Junqueira J.C.: *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. *Plos One*, **11**, e0150457 (2016)
6. Bartoszewicz M.: Fenotypowe i genotypowe podstawy tworzenia biofilmu przez gronkowce koagulazoujemne na cewnikach moczowych i naczyniowych – ocena morfologii struktury, sposoby eradykacji. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław (2013)
7. Belibasakis G.N., Charalampakis G., Nagihan B., Stadlinger B.: Periimplant infections of oral biofilm etiology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **830**, 69–84 (2015)
8. Berger D., Rakhamimova A., Pollack A., Loewy Z.: Oral Biofilms: Development, Control and Analysis. *High-Throughput, 7*(3), DOI:10.3390/ht7030024 (2018)
9. Berhe N., Tefera Y., Tintagu T.: Review on biofilm formation and its control options. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **4**, 122–133 (2017)
10. Berlanga M., Guerrero R.: Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb. Cell Fact.* **15**, DOI: 10.1186/s12934-016-0569-5 (2016)
11. Bhardwaj S.B.: Oral Biofilms. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **7**, 643–652 (2018)
12. Bik E.M., Long C.D., Armitage G.C., Loomer P., Emerson J., Mongodin E.F., Nelson K.E., Gill S.R., Fraser-Liggett C.M., Relman D.A.: Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* **4**, 962–974 (2010)
13. Bisht K., Wakeman C.A.: Discovery and Therapeutic Targeting of Differentiated Biofilm Subpopulations. *Front. Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.01908 (2019)
14. Bjarnsholt T.: The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*, **121**, 1–51 (2013)
15. Boudarel H., Mathias J.D., Blaysat B., Grédiac M.: Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *npj Biofilms and Microbiomes*, **4**, DOI: 10.1038/s41522-018-0062-5 (2018)
16. Brown S.A., Whiteley M.: A novel exclusion mechanism for carbon resource partitioning in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* **189**, 6407–6414 (2007)

17. Campisciano G., Zanotta N., Petix V., Corich L., De Seta F., Comar M.: Vaginal microbiota dysmicrobism and role of biofilm-forming bacteria. *Front. Biosci.* (*Elite Ed.).* **10**, 528–536 (2018)
18. Cavalcanti I.M., Del Bel Cury A.A., Jenkinson H.F., Nobbs A.H.: Interactions between *Streptococcus oralis, Actinomyces oris,* and *Candida albicans* in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle. *Mol. Oral Microbiol.* **32**, 60–73 (2017)
19. Chałas R., Wójcik-Chęcińska I., Woźniak M.J., Grzonka J., Święszkowski W., Kurzydłowski K.J: Dental plaque as a biofilm – a risk in oral cavity and methods to prevent. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **69**, 1140–1148 (2015)
20. Chevalier M., Ranque S., Prêcheur I.: Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro:* a review, *Medical Mycology*, **56**, 653–667, (2018)
21. Choudhary P., Singh S., Agarwal V.: Microbial Biofilms (in) Bacterial Biofilms, ed. Dincer S., Özdenefe M.S., Arku A., IntechOpen, 2020, DOI: 10.5772/intechopen.90790
22. Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia.* **1**, 40–52 (2007)
23. Das T., Kimyon O., Manefield M.J.: Bacterial Biofilms on Wounds, a Major Factor That Delays Wound Healing and a Potential Threat to Human Life and Economy (in) Biofilm, Pilonidal Cysts and Sinuses. Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds, ed. Shiffman M., Low M., vol 1, Springer, Cham, 2017, p.69–88
24. Dębicka P., Lipski M., Buczkowska-Radlińska J., Trusewicz M.: Biofilm formation on root canal- review. *Ann. Acad. Med. Stetin*. **54**, 152–156 (2008)
25. Diaz P.I., Strausbaugh L.D., Dongari-Bagtzoglou A.: Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front. Cell. Infect. Mi.* **4**, DOI: 10.3389/fcimb.2014.00101 (2014)
26. Drago L.: Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota, *Microorganisms,* **7**, DOI: 10.3390/microorganisms 7090278 (2019)
27. Dufour D., Leung V., Levesque C.M.: Bacterial Biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. **22**, 2–16 (2012)
28. Elgharably H., Hussain S.T., Shrestha N.K., Pettersson G.B.: Biofilm in Infective Endocarditis and Clinical Implications (in) Biofilm, Pilonidal Cysts and Sinuses. Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds, ed. Shiffman M., Low M, vol. 1. Springer, Cham, 2018, p. 109–120
29. Elias S., Banin E.: Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 990–1004 (2012)
30. Furtak A., Cześnikiewicz-Guzik M.: Skuteczna walka z biofilmem bakteryjnym – kluczowy element profilaktyki chorób jamy ustnej. *Med. Prakt. Stomatol.* **2**, 32–46 (2015)
31. Fields M.W., Sturman P., Anderson S.: The establishment of the CBE launched biofilms as a field of specialized research. *Biofilm,* **2,** https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100020 (2020)
32. Ge X., Rodriguez R., Trinh M., Gunsolley J., Xu P.: Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *Plos One,* **8**, e65520 (2013)
33. Gomez A., Nelson K.E..: The Oral Microbiome of Children: Development, Disease and Implications Beyond Oral Health. *Microb. Ecol.* **73**, 492–503 (2017)
34. Høiby N.: A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*, **125,** 272–275 (2017)
35. Hussain A., Ansari A.Z., Ahmad R.: Microbial biofilms: Human mucosa and intestinal microbiota (in) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering Microbial Biofilms: Current Research and Future Trends, ed. Yadav M.K., Singh B.K., Elsevier, 2019, p. 47–60
36. Jakubovics N.S.: Saliva as the Sole Nutritional Source in the Development of Multispecies Communities in Dental Plaque. *Microbiol. Spectr.* **3**, DOI: 10.1128/microbiolspec.MBP-0013-2014 (2015)
37. Jakubovics N.S., Kolenbrander P.E.: The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis*. **16**, 729–739 (2010)
38. Jung H., Ehlers M.M., Peters R.P.H, Lombaard H., Redelinghuys M.J., Bezuidenhoudt J.E. Kock M.M.: Growth Forms of *Gardnerella spp*. and *Lactobacillus spp.* On Vaginal Cells. *Front. Cell. Infect. Mi.* **10**, DOI:10.3389/fcimb.2020.00071 (2020)
39. Jung Y.G., Choi J., Kim S.K., Lee J.H., Kwon S.: Embedded biofilm, a new biofilm model based on the embedded growth of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 211–219 (2015)
40. Kelsey J., Kielian Y.T.: Biofilm-Leukocyte Cross-Talk: Impact on Immune Polarization and Immunometabolism. *J. Innate Immun.* **11**, 280–288 (2019)
41. Khatoon Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Emilio I. Alarcon E.I.: Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon,* **4,** e01067 (2018)
42. Kuang X., Chen V., Xu X.: Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms, *Biomed. Res. Int*. DOI:10.1155/2018/6498932 (2018)
43. Larsen T., Fiehn N.E.: Dental biofilm infections – an update. *APMIS,* **125,** 376–384, (2018)
44. Majumdar S.,Pal S.: Cross- species communication in bacterial world. *J. Cell. Commun. Signal.* **11**(2), 187–190 (2017)
45. Mang T.S., Tayal D.P., Baier, R.: Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Laser. Surg. Med.* **44**, 588–596 (2012)
46. Maresso A.W.: Biofilms (in) Bacterial Virulence, ed. Maresso A.W., Springer, Cham, 2019, p.145–153
47. Marsh P.D., Zaura E.: Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J. Clin. Periodontol.* **44**, S12–S22 (2017)
48. Merta U., Wiśniewska G.: Adhezja bakterii do materiałów dentystycznych – przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum,* **41**, 65–67 (2013)
49. Mombelli A.:Antimicrobial advances in treating periodontal diseases. *Front. Oral Biol.* 15, 133–148 (2012)
50. Montelongo-Jauregui D., Lopez-Ribot J.L.: Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. *J. Fungi*. **4**, DOI:10.3390/jof4040122 (2018)
51. Morse D.J., Wilson M.J., Wei X., Lewis M.A.O., Bradshaw D.J., Murdoch C., Williams D.W.: Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. *J. Med. Microbiol.* **67**, 364–375 (2018)
52. Neelakantan P., Romero M., Vera J., Daood U., Khan A.U., Yan A., & Cheung G.: Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *International journal of molecular sciences*, *18*(8), 1748 (2017), DOI:10.3390/ijms18081748
53. Ostrowska K., Strzelczyk A., Różalski A., Stączek P.: Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **67,** 1027–1033 (2013)
54. Otsuka R., Imai S., Murata T., Nomura Y., Okamoto M., Tsumori H., Kakuta E., Hanada N., Momoi Y.: Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation. *Microbiol. Immunol*. **59**, 28–36 (2015)
55. Palmer J.N., Gorski N.P. Biofilmy bakteryjne w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych, *Magazyn Otorynolaryngologiczny* (*special edition*), 3–10 (2007)

56. Park Y., Lee D.G., Hahm K.S.: HP(2–9)-magainin 2 (1–12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on Candida albicans by damaging the plasma membrane. *J. Pept. Sci*. **10**, 204–209 (2004)
57. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J.: Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej. *Postepy Hig. Med. Dosw*. **67**, 736–741 (2013)
58. Pokrowiecki R., Tyski S., Zaleska M.: Problematyka zakażeń okołowszczepowych. *Post. Mikrobiol*., **53**, 123–134 (2014)
59. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., O Sintim H.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**, 493–512 (2015)
60. Rosenthal M., Goldberg D., Aiello A., Larson E., Foxman B.: Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 839–848 (2011)
61. Sadowska B., Paszkiewicz M., Więckowska-Szakiel M., Różalska B.: New strategies to combat biofilm-associated infections. Part 2. Photodynamic Therapy. *Forum zakażeń,* **5**, 279–286 (2014)
62. Saugar J.M., Rodríguez-Hernández M.J., de la Torre B.G.; Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Ch.* **50**, 1251–1256 (2006)
63. Sanchez B., Delgado S., Blanco-Mıguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A.: Probiotics gut microbiota and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res*. **61**, 1–15 (2017)
64. Sanz M., Zaura E. i wsp.: Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **44**, S5–S11, (2017)
65. Săndulescu O., Săndulescu M.: Anti-biofilm Agents (in) Biofilm, Pilonidal Cysts and Sinuses Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds, ed. Shiffman M.A., Low M., Springer, 2020, p. 27–54
66. Shetty H., Gupta P.: Oral Biofilms: From Development to Assessment and Treatment (in) Dental Applications of Nanotechnology, ed. Chaughule R.S., Springer, Cham, 2018, p. 217–246
67. Szafrański S.P., Winkel A., Stiesch M.: The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J. Biotechnol*. **250**, 29–44 (2017)
68. Trafny E.A.: Jak zdobyć i wykorzystać wiedzę o wielogatunkowych biofilmach? *Post. Mikrobiol.* **51**, 205–211 (2012)
69. Trafny E.A.: Wzajemne oddziaływania drobnoustrojów w biofilmach wielogatunkowych. *Forum Zakażeń,* **3**, 13–16 (2012)
70. Valen H., Scheie A.A.: Biofilms and their properties. *Eur. J. Oral Sci*. **126**, 13–18 (2018)
71. Verderosa A.D., Totsika M., Fairfull-Smith K.E.:Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.* **7,** DOI: 10.3389/fchem.2019.00824 (2019)
72. Wang Z., Shen Y., Haapasalo M.: Antibiofilm peptides against oral biofilms. *J. Oral Microbiol*. **9**, DOI:10.1080/20002297.2017.1327308 (2017)
73. Wiater A., Pleszczyńska M., Szczodrak J., Bachanek T.: Removal of Denture Plaque by Selected Glucanolytic Enzymes. *Dent. Med. Probl*. **42**, 241–247 (2005)
74. Wielgosińska M., Zielińska E., Niska K., Górska M., Woźniak M.: Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej (in) Na pograniczu chemii i biologii, ed. Koroniak H., Barcidzewski J., Wydawnictwo Naukowe UAM, vol. 34, Poznań, 2015, p. 175–188
75. Wu Y., Cai P., Jing X., Niu X., Ji D., Ashry N.M., Gao C., Huang Q.: Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. *Environ. Int.* **132**, DOI: 10.1016/j.envint.2019.105116 (2019)
76. Zhang T., Wang Z., Hancock R.E., de la Fuente-Núñez C., Haapasalo M.: Treatment of Oral Biofilms by a D-Enantiomeric Peptide. *Plos One,* **11**, e0166997 (2016)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 59–75
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.06

TECHNOLOGIE „FOOD-OMICS" W PROFILOWANIU METAGENOMU ŻYWNOŚCI

Edyta Juszczuk-Kubiak[1]*, Monika Greguła-Kania[2], Barbara Sokołowska[1]

[1] Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie
[2] Instytut Hodowli Zwierząt i Ochrony Bioróżnorodności, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w listopadzie 2020 r.

Streszczenie: Nowoczesne badania w dziedzinie nauk o żywności i żywieniu przechodzą od klasycznych metodologii do zaawansowanych strategii molekularnych, w których kluczową rolę odgrywa technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Foodomika, która została niedawno zdefiniowana jest nowym, globalnym podejściem wykorzystującym zaawansowane technologie „omics" w analizach żywności. W ostatnich latach technologie „food-omics" są szeroko stosowane w mikrobiologii żywności w kierunku identyfikacji, kwantyfikacji i śledzenia mikrobiologicznych konsorcjów żywnościowych oraz oceny jakości i bezpieczeństwa żywności. Metagenomika, zwana genomiką populacji drobnoustrojów jest opartą na sekwencji niezależną od hodowli analizą zbiorowych genomów mikroorganizmów obecnych w danym środowisku. Ta szybko rozwijająca się technika dostarczyła nowych informacji na temat różnorodności taksonomicznej i dynamiki społeczności mikroorganizmów na poziomie rodzaju, gatunku a nawet szczepu. Zintegrowane podejście metagenomiczne okazało się potężnym narzędziem w profilowaniu ekologii mikrobiologicznej złożonych ekosystemów takich jak żywność fermentowana. Obecne kierunki badań koncentrują się na zrozumieniu i możliwości kontroli procesu fermentacji w celu zapewnienia stałych właściwości sensorycznych produktów, zwiększenia bezpieczeństwa i ograniczenia psucia się żywności. Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie najnowszych osiągnięć w zakresie wykorzystania technologii „food-omics" w analizach bioróżnorodności i funkcjonalności metagenomu produktów żywnościowych, bezpieczeństwa żywności i kontroli jakości oraz bieżących wyzwań i potencjalnych zastosowań.

1. Wstęp. 2. Metodologie i technologie w dziedzinie „food-omics". 3. Zastosowanie technologii „food-omics" w analizach żywności. 3.1. Metagenomika jako narzędzie do monitorowania procesu fermentacji. 3.2. Monitorowanie warunków przechowywania żywności. 3.3. Monitorowanie bezpieczeństwa żywności. 4. Podsumowanie

"FOOD-OMICS" APPLICATIONS IN THE FOOD METAGENOM PROFILING

Abstract: Modern research in food science and nutrition is transferring from classical methodologies to advanced molecular strategies in which next-generation sequencing (NGS) technology plays a crucial role. In this context, Foodomics has been recently defined as a new and global field using advanced "omics" technologies in food analysis. In recent years, "food-omics" technologies are widely applicated in food microbiology to identify, quantify and to track food microbial consortia in the food chain, as well as in the food safety and quality assessment. Metagenomics, referred to as community genomics is a sequence-based analysis of the collective genomes of microorganisms present in a given environment. This rapidly developing technique has provided new knowledge about taxonomic diversity and the dynamics of microbial communities at the genus, species and even strain level. An comprehensive metagenomic approach has proven to be a powerful tool in profiling the microbial ecology of complex ecosystems such as fermented foods. Currently, research focuses on understanding and controlling the fermentation process to ensure the consistent sensory properties of food products, increase safety and reduce food spoilage. The goal of this review is to provide an overview of the latest achievements of the "food-omics" technologies applied to biodiversity and functionality of food microflora, food safety and quality control. Furthermore, we discuss current challenges and future applications of "food-omics" technologies in the food industry.

1. Introduction. 2. Methodologies and technologies in the field of food-omics. 3. Application of "food-omics" technology in food analysis. 3.1. Metagenomics as a tool for monitoring the fermentation process. 3.2. Monitoring food storage conditions. 3.3. Food safety monitoring. 4. Summary

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo i jakość żywności, „food-omics", metagenomika, sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)
Keywords: food safety and quality, „food-omics", metagenomics, next generation sequencing (NGS)

1. Wstęp

Technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS, Next Generation Sequencing), zwana również wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem (HTS, High Throughput Sequencing) wraz wielkoskalowymi technikami „omics" stała się powszechnie wykorzystywanym narzędziem w dziedzinie nauk o żywności i żywieniu. W 2009 roku grupa Cifuentesa zaproponowała nową koncepcję oraz praktyczne podejście „foodomiki"

* Autor korespondencyjny: Edyta Juszczuk-Kubiak, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie, ul. Rakowiecka 36, Warszawa; tel. 22 606 36 26, fax. 22 849 04 26;
e-mail: edyta.juszczuk-kubiak@ibprs.pl

do wdrożenia metod „omics" w analizach żywności [8]. Obecnie, foodomika jest definiowana jako nowa, globalna dyscyplina, która łączy dziedziny badań żywności i żywienia przy użyciu zaawansowanych technologii omicznych, tj. genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika oraz bioinformatyka, umożliwiając przeprowadzenie kompleksowej oceny mikrobiologicznej produktów spożywczych [90]. Zainteresowanie technologiami „food-omics" zbiega się z wyraźną zmianą trendu w medycynie i biotechnologii w kierunku popularyzacji zdrowego żywienia i zapobiegania chorobom cywilizacyjnym, a także z promocją tak zwanej żywności funkcjonalnej [10].

Metagenomika, jako dyscyplina foodomiki, zwana również genomiką populacji mikroorganizmów, umożliwia dokładną charakterystykę mibrobioty (d. mikroflory) spożywczej pod kątem genetycznym dając podstawę do dalszych analiz filogenetycznych i funkcjonalnych, bez konieczności ich hodowli w oparciu o klasyczne metody [20]. Już w tej chwili możliwe jest dokonanie precyzyjnej i szybkiej identyfikacji drobnoustrojów na poziomie rodzaju, a nawet gatunku oraz określenie ich zasobów genetycznych. W ostatnich latach technologia HTS w oparciu o analizy metagenomiczne jest szeroko stosowane w analizach mikrobiologii żywności, obejmujących profilowanie metagenomu produktów spożywczych, typowanie szczepów oraz monitorowanie procesów przechowywania i produkcji żywności [5, 35]. Zintegrowane techniki metagenomowe ujawniły nowy wgląd w dynamikę ekosystemów fermentacyjnych oraz charakterystykę różnorodności i interakcji gatunków mikroorganizmów w trakcie tego procesu. Wykazano, że wzajemne interakcje mikrobioty jelit i mieszanych konsorcjów mikrobioty ziaren kefirowych mogą mieć pozytywny wpływ na jakość produktów fermentowanych poprzez wymianę „informacji" i metabolitów. Zjawisko wyczuwania liczebności (quorum sensing) może odgrywać istotną rolę w złożonych społecznościach mikroorganizmów biorących udział w procesie fermentacji [81]. W oparciu o profilowanie mikrobioty fermentowanych produktów opisano szereg nowych szczepów starterowych, które mają istotne znaczenie w przemyśle spożywczym przy opracowaniu nowej gamy produktów mlecznych, tj. sery i kefir [1, 14]. W odniesieniu do bezpieczeństwa żywności, zastosowanie zintegrowanych analiz metagenomów fermentacyjnych znacząco przyczyniło się do zrozumienia biologicznych i biochemicznych procesów produkcyjnych lokalnej fermentowanej żywności [21, 30]. Jednym z kluczowych zastosowań zintegrowanych technologii „food-omics" w przemyśle spożywczym jest zrozumienie pierwotnej przyczyny skażeń żywności oraz szybkiej i precyzyjnej charakterystyki patogenów w celu zapewnienia odpowiedniej kontroli bezpieczeństwa i jakości żywności w całym łańcuchu żywnościowym [20, 45].

W niniejszym przeglądzie przedstawiamy najnowsze postępy w badaniach metagenomu produktów żywnościowych z wykorzystaniem technologii „food-omics" w celu wyjaśnienia w jaki sposób to podejście może być cennym narzędziem w dokładniejszej charakterystyce żywności i jej biotransformacji oraz opracowaniu strategii kontroli jakości i bezpieczeństwa żywności. Ponadto, omawiamy aktualne wyzwania oraz przyszłe zastosowania zintegrowanych technologii „food-omics" w przemyśle spożywczym.

2. Metodologie i technologie w dziedzinie „food-omics"

W ostatniej dekadzie wysokoprzepustowe sekwencjonowanie (HTS) przekształciło się z narzędzia badawczego w rutynowe stosowanie w wielu dziedzinach, w tym diagnostyce, badaniach epidemiologicznych, analizach mikrobiologicznych żywności, monitorowaniu skażeń żywności oraz analizach autentyczności produktów spożywczych [6, 35]. Dostępność tak potężnego zestawu narzędzi oferuje ogromne możliwości analizy metagenomów żywności w celu zapewnienia wydajności procesu, jakości produktu i bezpieczeństwa żywności.

Modelowy eksperyment metagenomiczny zakłada charakterystykę różnorodności taksonomicznej mikroorganizmów (bakterie, grzyby) poprzez klasyfikację zakonserwowanych sekwencji markerów (np. rDNA). Analogiczne podejście można również zastosować do charakterystyki chemotypów, wykorzystując zdolność mikroorganizmów do produkcji różnych klas metabolitów wtórnych, dzięki niezwykle różnorodnym genom szlaku biosyntezy [6]. Przygotowanie eksperymentu z zakresu metagenomiki przebiega w kilku etapach: (1) izolacja DNA, (2) tworzenie bibliotek dla docelowych grup taksonomicznych, (3) sekwencjonowanie z wykorzystaniem platformy, (4) analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania, oraz (5) szczegółowy raport. Zalety badań profilowania metagenomu opartego na HTS w porównaniu do metod tradycyjnych, obejmują: (1) możliwość identyfikacji tysięcy mikroorganizmów w czasie pojedynczej analizy; (2) możliwość identyfikacji bioróżnorodności gatunkowej, jak i obfitości ich wzrostu; (3) możliwość identyfikacji nowych gatunków i szczepów mikroorganizmów, których identyfikacja w laboratorium jest niemożliwa; (4) bardzo szybki screening złożonych konsorcjów mikrobioty oraz (5) lepsze zrozumienie procesów fizjologicznych w celu kontroli mikrobioty.

Metagenomika to termin, który jest często używany do opisania 3 różnych podejść: (1) określenie całej sekwencji genomu pojedynczego hodowanego izolatu, zwane jako „sekwencjonowanie całego genomu" (WGS), (2) „metagenomika", w której NGS generuje

sekwencje całej genomowej zawartości społeczności, zwane jako „losowe sekwencjonowanie" (WMG) oraz (3) sekwencjonowanie amplikonu w oparciu o określone rodziny genów markerowych [35]. Analizy amplikonu wykorzystują markery genetyczne w oparciu o regiony hiperzmienne (16S, bakterie) i transkrybowanej transkrypcji wewnętrznej (ITS, grzyby) a wyniki wysokoprzepustowego sekwencjonowania generowane są z dużą liczbą odczytów danej sekwencji w ciągu jednej analizy. Masowe równoległe sekwencjonowanie tych apmlikonów (metabarkoding, profilowanie mikrobiologiczne) generuje szereg informacji na temat złożonej mikrobioty różnych nisz ekologicznych. Jedną z korzyści metody opartej na amplikonach jest możliwość śledzenia kolejnych populacji drobnoustrojów w czasie na różnych poziomach taksonomicznych. W porównaniu z losowym sekwencjonowaniem metagenomu (WMG), metody oparte na 16S rDNA i ITS, umożliwiają szczegółowy wgląd w dynamikę różnorodności populacji mikroorganizmów w odpowiednim czasie lub pod wpływem zmian warunków środowiska. Zazwyczaj sekwencjonowanie amplikonu ogranicza się do identyfikacji na poziomie rodzaju, chociaż niektóre analizy osiągnęły przypisanie na poziomie gatunku, dzięki dedykowanym klasyfikatorom gatunku i zastosowaniu dłuższych technologii odczytu [75].

Metagenomika, oparta na losowym sekwencjonowaniu genomu (WMS) ma klika zalet w porównaniu z podejściem opartym o amplikony. Wyjątkową zaletą WMS jest możliwość monitorowania dynamiki populacji mikroorganizmów i ich potencjału metabolicznego bezpośrednio w matrycy, a tym samym identyfikacji i charakterystyki szerokiej gamy genów, w tym nowych genów i operonów całej społeczności drobnoustrojów. Co więcej, możliwe jest otrzymanie kompletnych genomów mikrobiologicznych z metagenomów, uzyskując w ten sposób rozdzielczość na poziomie szczepu. Sekwencjonowanie całego genomu (WGS) jest szeroko stosowane do badań pod kątem wykrywania, identyfikacji i charakterystyki patogenów, dostarczając cennego i szybkiego obrazu obecności markerów genetycznych, określających serotyp, zjadliwość czy oporność patogenu [26]. Chociaż sekwencjonowanie WMS zapewnia znacznie dokładniejszą charakterystykę taksonomiczną i genetyczną populacji mikroorganizmów, koszt analiz jest wciąż znacznie wyższy w porównaniu z podejściem opartym na amplikonie.

Najczęściej stosowane platformy do sekwencjonowania metagenomu w oparciu o 16S rDNA i ITS, to sekwenator Miseq (Illumina) oraz Ion Torrent Personal Machine (PGM) firmy Life Technologies. Platformy wysokoprzepustowe nowej generacji, tj. NexSeq 500, i seria Hiseq (Illumina) oraz Ion Torrent (Life Technologies) umożliwiają sekwencjonowanie genomów zarówno organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Sekwenatory Illumina i Ion różnią się znacznie pod względem chemii do sekwencjonowania, wydajności (długość odczytu, pokrycie), dokładności i kosztu analiz. Wybór platformy zależy od celu analiz i potrzeb użytkownika oraz od przepustowości sekwencjonowania. Ważnymi platformami do analiz sekwencjonowania metagenomów są również platformy PacBio RS II (Pacific Biosciences) i Nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies) należące do sekwenatorów trzeciej generacji (Third Generation Sequencing, TGS). PacBio wykorzystuje technologię sekwencjonowania pojedynczych cząsteczek w czasie rzeczywistym (SMRT), podczas gdy MinION technologię nanoporów [75]. Co ważne odczyty generowane przez PacBio i MinION są znacznie dłuższe niż generowane przez sekwenatory Illumina i Ion, co powoduje, ze obie platformy są dedykowane do sekwencjonowania genomu *de novo* i kompletnego składania genomów bakteryjnych. Strategie sekwencjonowania trzeciej generacji (TGS) nie są jednak rutynowo stosowane w analizach mikrobiomów. Niedawno do sekwencjonowania pełnej długości amplikonów 16S rDNA wykorzystano platformę MinION trzeciej generacji wygenerowaną z syntetycznej społeczności dziesięciu gatunków drobnoustrojów o różnej liczebności [52]. Profilowanie całego amplikonu 16S rDNA na podstawie MinION prawidłowo identyfikowało gatunki, a profile taksonomiczne korelowały z określonym poziomem ich liczebności. Ta technika oferuje pewne ulepszenia pod względem głębokości danych uzyskanych w porównaniu z obecnymi strategiami 16S rDNA, umożliwiając charakterystykę mikroorganizmów na poziomie gatunku. Wkrótce można się spodziewać, ze platformy TGS zyskają szersze zastosowanie związane z mikrobiologią żywności.

Dzięki rozwojowi technologii „omics" metagenomika oparta na sekwencjonowaniu DNA, została poszerzona o analizy profilowania metatranskryptomu (RNA-seq), metaproteomu i metabolomu. Metatranskryptomika obejmuje sekwencjonowanie cDNA, wygenerowane z transkryptów mRNA w pojedynczej próbie zmieszanej społeczności mikroorganizmów w celu globalnej analizy ekspresji genów. Kompleksowe analizy metagenomu z zastosowaniem RNA-seq umożliwiają funkcjonalną identyfikację szlaków metabolicznych o istotnym znaczeniu dla produkcji nie opisanych wcześniej metabolitów. Profilowanie ekspresji genów umożliwia również poznanie zmian ekspresji genów mikroorganizmów w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, tj. temperatura, wilgotność, składniki pokarmowe [15]. W przemyśle spożywczym techniki oparte na profilowaniu metagenomów, mogą znaleźć zastosowanie w optymalizacji procesów produkcyjnych oraz w monitorowaniu autentyczności i bezpieczeństwa żywności.

W mikrobiologii żywności metabolomikę i metaproteomikę stosuje się odpowiednio do identyfikacji i oceny ilościowej metabolitów i białek drobnoustrojów w matrycy żywności. Spośród enzymów o dużym znaczeniu biotechnologicznym, szczególnie poszukiwane są lipazy i esterazy, pektynazy czy endonukleazy. Takim bogatym źródłem identyfikacji nowych metabolitów jest metagenom żywności [15]. Analizy oparte o spektrometrię mas (MALDI-TOF MS) czy chromatografię cieczową (LC) umożliwiają analizę proteomu i metabolomu mikroorganizmów w celu identyfikacji ważnych szlaków metabolicznych, w tym metabolitów wtórnych o potencjalnym zastosowaniu w biotechnologii, rolnictwie i przemyśle spożywczym.

3. Zastosowanie technologii „food-omics" w analizach żywności

3.1. Metagenomika jako narzędzie do monitorowania procesu fermentacji

Fermentowane produkty na bazie mleka

Metagenomika jest cennym narzędziem do identyfikacji społeczności mikroorganizmów w procesie fermentacji żywności. W przemyśle spożywczym technika ta została wykorzystana w opracowaniu profili taksonomicznych mikrobioty jogurtów, kefirów czy serów, a także do monitorowania etapów ich dojrzewania [14]. Analizy taksonomiczne i funkcjonalne mikrobioty uczestniczącej w tradycyjnych procesach fermentacyjnych umożliwiły identyfikację rdzennych kultur starterowych oraz dowiodły, że manipulując procesami produkcji w sposób istotny można stymulować środowisko mikrobioty w kierunku uzyskania fermentowanego produktu o pożądanych walorach organoleptycznych przy jednoczesnym zachowaniu wymaganych właściwości produktu. Wykazano, że różne rodzaje serów dojrzewających różnią się profilem gatunkowym mikroorganizmów, który jest istotnie skorelowany z poszczególnymi etapami ich dojrzewania. Na przykład, metagenom serów dojrzewających półtwardych cechował się wyższym składem ilościowym *Lactococcus lactis* i *Staphylococcus xylosus* w porównaniu do serów dojrzewających twardych, dla których charakterystyczny skład mikrobioty stanowiły *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* i *Lactobacillus helveticus* [89].

Ponadto kilka badań dotyczyło oceny różnorodności taksonomicznej oraz metabolicznej mikrobioty serów w obrębie trzech badanych typów skórek; skórka z porostem pleśni (Brie i Camembert), naturalna skórka sera z mleka niepasteryzowanego (St. Nectaire i Tomme de Savoie), skórka serów pielęgnowanych i przemywanych (Taleggio, Gruyere i Epoisses), pobranych ze 137 różnych typów sera pochodzących z 10 krajów Europy i Stanów Zjednoczonych [89]. W produkcji serów tradycyjnie dojrzewających na ich powierzchni tworzy się biofilm, zwany skórką, składający się z gatunków bakterii i grzybów pochodzących z surowego mleka, kultur starterowych oraz „starzejącego" się środowiska [46]. Analizy oparte na wysokprzepustowym sekwencjonowaniu (HTS) w oparciu o 16S rDNA i ITS, wykazały, że profil taksonomiczny mikrobioty jest istotnie zróżnicowany w serach w zależności od typu skórki, pH i wilgotności środowiska produkcji, niezależnie od pochodzenia geograficznego. Wzory składu taksonomicznego i sukcesji metagenomu serów wykazały obecność 24 rodzajów bakterii (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*) i grzybów (*Saccharomycetales*, *Microascales*, *Hypocreales*, *Eurotiales*) oraz stwierdzono, że co najmniej 60% bakterii i 25% grzybów nie należało do kultur starterowych [89]. Ponadto, zidentyfikowano dwa rodzaje bakterii, Yaniella i *Nocardiopsis*, o których nigdy nie informowano w ekosystemach mikrobiologicznych żywności. Stwierdzono również że halotolerancyjne γ-*Proteobacteria*, tj. *Vibrio*, *Halomonas* i *Pseudoalteromonas,* związane ze środowiskiem morskim były szeroko rozpowszenione w biofilmach serów wytwarzanych we wszystkich regionach geograficznych. Kilka taksonów grzybowych (*Scopulariopsis*, *Aspergillus*) i bakteryjnych (*Actionobacteria*, *Staphylococcus*) dominujących w skórkach serów St. Nectaire i Tomme de Savoie, wykazało pozytywną korelację z parametrami wilgotności w trakcie procesu dojrzewania. Sery Taleggio, Gruyere i Epoisses, znane z ich ostrych aromatów, były wzbogacone w wiele ścieżek metabolicznych zaangażowanych w produkcję związków smakowych, obejmujących szlak cysteiny i metioniny powiązany z wytwarzaniem lotnych związków siarki oraz szlak degradacji waliny, leucyny i izoleucyny powiązany ze specyficznym aromatem tych serów [55]. *Pseudoalteromonas*, obficie zidentyfikowane w serach Brie i Camembert oraz Taleggio posiadały gen kodujący gamma-liazę metioninową (*mgl*) przekształcającą L-metioninę w metanotiol, powodując powstawanie lotnych związków siarki nadających tym serom specyficzny aromat. Ponadto, w genomie *Pseudoalteromonas haloplanktis* zidentyfikowano geny kodujące lipazy i proteazy przystosowane do zimna, uczestniczące w lipolizie i proteolizie oraz γ-liazę metioniny ważnego enzymu w produkcji siarki. Enzymy te uważana są za korzystne w serze dojrzewającym i przechowywanym w niskich temperaturach, ponieważ przyczyniają się do powstawania korzystnych związków smakowych [89].

W odniesieniu do bioróżnorodności mikroorganizmów lub potencjału funkcjonalnego analiza przestrzennego rozkładu aktywnej mikrobioty trzech włoskich serów Fiore Sardo, Pecorino Siciliano i Pecorino Toscano wykazała istotną korelację między mezofilnymi LAB (*Lactobacillus plantarum*) i wtórną proteolizą,

a także syntezą składników lotnych, tj. estry, alkohole, aldehydy i związki siarki [16]. Analizy metatranskryptomiczne odegrały kluczową rolę w zrozumieniu procesów fermentacji i dojrzewania sera Camembert i Reblochon [46]. Badania funkcjonalne w oparciu o RNA-seq wykazały, że geny związane ze szlakami metabolicznymi odpowiedzi na stres były różnie wyrażane podczas dojrzewania sera. Obserwowany profil ekspresji genów był istotnie zróżnicowany w pierwszych dwóch tygodniach okresu dojrzewania. Geny szlaku katabolizmu aminokwasów *Debaryomyces hansenii* i *Geotrichum candidum*, były skorelowane z parametrami smaku i tekstury sera. Dodatkowo, analizy 16S rDNA wykazały, że podczas degradacji matrycy mlecznej dominującymi gatunkami mikrobioty serów były *L. lactis*, *Corynebacterium casei*, *Debaryomyces hansenii* oraz *Geotrichum candidum*. Ponadto, uzupełniające badania Monnet i wsp. [59] wyjaśniły rolę szczepu *Geotrichum candidum* w różnych fazach dojrzewania sera typu Reblochon. Szczep *Geotrichum candidum* był ważny w pierwszej fazie procesu dojrzewania, w której ekspresja genów związanych z katabolizmem aminokwasów była istotnie wysoka. Podejście metatranskryptomiczne umożliwiło stworzenie funkcjonalnych profili genów i szlaków metabolicznych skorelowanych z parametrami smaku, zapachu i tekstury sera [12].

Podejście metagenomiczne w oparciu o analizy HTS znalazły zastosowanie również w odniesieniu do bioróżnorodności i funkcji mikrobioty podczas naturalnej fermentacji serów rzemieślniczych, objętych chronioną nazwą pochodzenia (ChNP), których produkcja odbywa się bez udziału kultur starterowych. Analizy w oparciu o WMS i 16S rDNA zostały użyte do prześledzenia profilu populacji bakteryjnej meksykańskiego sera Cotija, otrzymywanego na bazie surowego mleka krowiego [21]. Dojrzewanie Cotija odbywa się w otwartym środowisku, w którym wilgotność i temperatura są ważnymi parametrami fermentacji. Ponadto, drewniane powierzchnie używane do zagniatania skrzepu podczas solenia są źródłem rezydentnej mikrobioty, występującej w serze. Około 80% bakteryjnej populacji Cotija składało się z *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Weissella paramesenteroides*, a drewniane powierzchnie były najprawdopodobniej źródłem obecnych gatunków *Leuconostoc* i *Weissella*. Analizy szlaków metabolicznych wykazały, że gatunki te są odpowiedzialne za rozwój autentycznych związków smakowo-zapachowych wynikających z ich aktywności lipolitycznej i proteolitycznej podczas procesu dojrzewania. Klasyfikacja sieci metabolicznych ujawniła dodatnie korelacje mikrobioty sera z katabolizmem fenyloalaniny i aminokwasów oraz produkcją enzymów biorących udział w katabolizmie wolnych kwasów tłuszczowych, tj. reduktaza karbonylowa i monooksydaza fenolowa. Ścieżki metaboliczne w odniesieniu do smaku i aromatu, zostały również wychwycone w oparciu o analizy WMS, w badaniach mikrobioty innego, rzemieślniczego sera chińskiego Kazak, wytwarzanego podczas spontanicznej fermentacji świeżego mleka krowiego w torbach ze skóry koziej. Dominujące *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Kurthia* i *Moraxella* wykazały dodatnie korelacje ze szlakiem metabolizmu aminokwasów, tj. kwas glutaminowy, histydyna, izoleucyna i prolina. Wśród grzybów *Dipodascus* korelował ze stężeniem kwasu 9-oktadecenowego, *Pichia* i *Penicillium* z kwasem 9-heksadecenowym, a *Issatchenkia* i *Candida* były skorelowane z poziomem leucyny i fenyloalaniny oraz z syntezą lotnych związków (estry, alkohole, aldehydy) [96].

Analizę 16S rDNA wykorzystana do identyfikacji, typowania i charakterystyki mikrobiomu tradycyjnego wędzonego polskiego sera, Oscypka, produkowanego z surowego mleka bez kultur starterowych [1]. Dominującą grupę bakterii stanowiły *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, natomiast *Bifidobacteriaceae* oraz *Moraxellaceae* (głównie *Enhydrobacter*) stanowiły niski odsetek (0,7% i 4%) całkowitej puli społeczności bakteryjnej Oscypka. Ponadto w świeżym serze zanurzonym w solance zidentyfikowano kilka rodzajów bakterii związanych ze środowiskiem morskim, tj. *Sanguibacter*, *Flavobacteriaceae*, *Tetragenococcus* oraz *Chromohalobacter* spp. Niektóre z tych grup obejmowały patogeny oraz bakterie przyczyniające się do psucia produktów żywnościowych. Podczas procesu produkcji sera zaobserwowano zmiany w składzie populacji *Lactobacillales* (*Firmicutes*), *Streptococcus*, *Enterococcus, Flavobacteriaceae, Leuconostoc* i *Bifidobacteriaceae* (*Actinobacteria*), których liczba zmniejszyła się istotnie po etapie solanki i wędzenia; odwrotne zależności zaobserwowano dla *Lactococcus*. Obserwowany spadek liczby *Enterococcus* podczas wędzenia sera sugeruje, że proces ten ma istotny wpływ na poprawę jakości i bezpieczeństwa tradycyjnie wytwarzanego produktu. Przypuszcza się, że podczas procesu wędzenia powstające lotne związki fenolowe o właściwościach bakteriostatycznych, mogą hamować wzrost populacji tych drobnoustrojów. Ponadto, selektywne obniżenie liczby tych drobnoustrojów może wynikać z zakwaszenia środowiska podczas procesu lub wytwarzanych metabolitów przeciwdrobnoustrojowych przez szczepy LAB [1]. Na uwagę zasługuje również obecność populacji *Actinobacteria* (0,97%), należących do rodziny *Bifidobacteriaceae* i gatunku *Bifidobacterium,* które mogą stanowić duży potencjał biotechnologiczny jako kultury pomocnicze w procesie tradycyjnego wytwarzania Oscypka.

Dostępność tych informacji może być przydatna nie tylko pod względem wyboru kultur starterowych specyficznych dla serów wytwarzanych w warunkach rzemieślniczych, a także do podkreślenia konieczności przestrzegania niektórych środków higieny,

które powinny być podjęte w celu poprawy bezpieczeństwa produktu.

Fermentowane napoje na bazie roślinnej

W ostatnich latach, w przemyśle winiarskim nastąpił gwałtowny wzrost zastosowania wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania (HTS) do szczegółowej oceny złożonych społeczności mikrobiomu winorośli i wina. Szczególny nacisk kładziony jest zrozumienie dynamiki procesu fermentacji, jej kontroli oraz identyfikacji nowych kultur starterowych [48]. Winogrona i moszcz winny zawierające złożony mikrobiom, odgrywają kluczową rolę w fermentacji wina, wpływając na jego smak i aromat, a tym samym na ostateczną jakość i styl. Globalne badania z wykorzystaniem metagenomiki zostały wykorzystane w celu profilowania różnorodności mikroorganizmów, zarówno grzybowych jak i bakteryjnych związanych ze spontanicznymi fermentacjami wina, biorąc pod uwagę zarówno odmiany winorośli oraz region ich uprawy [60]. Stwierdzono, że wina produkowane w różnych regionach charakteryzują się odmiennym składem taksonomicznym mikrobioty, korelującym z odmiennym profilem metabolitów wtórnych odzwierciadlającym specyficzny *terroir* wina danego regionu [66]. Rozkład biogeograficzny związany z winem został zbadany w winnicach z rożnych regionów Kalifornii [2], Nowej Zelandii [86] oraz w tradycyjnych, biodynamicznych i zintegrowanych winnicach z południa Afryki [77]. Analizy 18S rDNA wykazały, że wzory geograficzne metagenomu wina są bardziej zróżnicowane dla populacji grzybów. Wykazano znaczący związek *Aspergillus* i *Penicillium* spp. z winem Chardonnay z Napie. Natomiast *Saccharomycetes* i *Erysiphe necator* stanowiły istotną populację mikrobioty wina produkowanego w centralnej części wybrzeża Kalifornii [3]. Charakterystyczne profile biogeograficzne zarówno dla społeczności grzybowych, jak i bakteryjnych występujące w początkowych etapach fermentacji moszczu winogron mogą przyczyniać się do wytworzenia cennego stylu oraz unikalnych walorów sensorycznych win regionalnych [70].

Analizy 16S rDNA i ITS zostały również wykorzystane do określenia różnorodności i dynamiki metagenomu wina, sześciu portugalskich apelacji (Minho, Douro, Dão, Bairrada, Estremadura, Alentejo) w odniesieniu do poszczególnych etapów fermentacji oraz ich potencjału funkcjonalnego [60]. Skład populacji mikroorganizmów w trakcie początkowego procesu fermentacji był istotnie skorelowany z filosferą winorośli oraz składem metagenomu gleby. Rodzaje *Botryotinia*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula* czy *Sphingomonas* były charakterystyczne dla mikrobiomu winorośli oraz winnic. Analizy 16S rDNA wykazały, że wśród społeczności bakterii *Enterobacteriaceae* (*Tatumella* sp.) stanowiły dominującą mikrobiotę we wszystkich apelacjach, z wyjątkiem Alentejo, dla którego dominującą populacją były *Halomonadaceae* (*Halotalea* i *Zymobacter*). Społeczności grzybowe charakteryzowały się zarówno obecnością mikroorganizmów środowiskowych i fitopatogenów w moszczu winogron, jak też drożdży związanych z fermentacja alkoholową, tj. *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Sporothrix* czy *Schizosaccharomyces*. Ponadto, zmiany różnorodności biologicznej w trakcie procesu fermentacji ujawniły większą dynamikę struktury społeczności grzybowej w porównaniu z populacjami bakterii. Analizy HTS genu 18S rDNA podczas spontanicznej fermentacji moszczu winogronowego Aglianico i Greco di Tufo wykazały, że dynamika społeczności grzybów podczas fermentacji obejmuje spadek liczby grzybów i drożdży innych niż *Saccharomyces* [14]. Na początku fermentacji znaleziono złożony mikrobiom charakteryzujący się dominacją *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina* oraz *Pichia fermentans*. Natomiast *Saccharomyces cerevisiae* stał się dominujący po 6 dniach fermentacji wina, przy czym *C. zemplinina* występowała nadal na wysokim poziomie. Ponadto, zaobserwowano dodatnie korelacje *S. cerevisiae* z poziomem cukru oraz stężeniem etanolu i glicerolu oraz stwierdzono, że obecność *Candida*, *Hanseniaspora* i *Issatchenkia* w mieszanych współfermentacjach z *S. cerevisiae* poprawia profil smaku i aromatu wina [2, 14]. Analiza 16S rDNA i ITS mikrobioty podczas fermentacji wina z suszonych winogron (słodkie Vino Santo Trentino) wykazała, że na wczesnych etapach fermentacji stężenie glukozy i etanolu oraz pH moszczu odgrywają istotną rolę w kształtowaniu populacji mikrobiomu, przy czym kwasowość moszczu odgrywa dominującą rolę, zarówno przy wyborze początkowej populacji grzybów, jak i definiowaniu ich właściwości fermentacyjnych [82]. Biorąc pod uwagę, że bakterie i grzyby mogą wpływać na siebie poprzez konkurencję metaboliczną/synergię lub modyfikację środowiska wykazano, że silne korelacje pomiędzy *Candida ethanolica*, *Pichia fermentans* a *Hymenobacter* oraz *Psychrobacterium* i *Ralstonia* przyczyniają się do pożądanych właściwości organoleptycznych końcowego produktu.

Profilowanie 16S rDNA oraz metabolomika zostały wykorzystane do analizy zależności między bioróżnorodnością i dynamiką mikrobioty a profilem metabolicznym fermentowanego chińskiego wina ryżowego Shaoxing [49] oraz Wuyi Hong Qu [32]. Wino Shaoxing produkowane jest z ryżu z dodatkiem pszenicy Qu jako środka scukrzającego oraz drożdży (*S. cerevisiae*) jako startera fermentacyjnego. Ze względu na szczególny proces warzenia, obejmującego fermentację wstępną w wyższej temperaturze (28–30°C) przez okres 4 dni oraz fermentację wtórną w niższej temperaturze (16–18°C) przez długi czas (20 dni), wina ryżowe mają unikalne cechy smakowe. Mikrobiota fermentacyjna

buduje złożoną symbiotyczną relację podczas procesu warzenia i odgrywa ważną rolę w produkcji związków smakowych wina decydując o jego ogólnej jakości. Analizy metagenomiczne 16S rDNA wykazały bogatą różnorodność bakteryjną w fermentowanych zacierach oraz istotne zróżnicowanie profilu taksonomicznego mikrobioty w początkowych i końcowym etapie procesu [32, 49]. Jako główne taksony w procesie fermentacji wina Shaoxing sklasyfikowano 10 dominujących rodzajów bakterii (*Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Thermoactinomyces*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*). Analizy metabolomiczne wykazały, że związki karbonylowe obecne w winie były dodatnio skorelowane z *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* i *Weissella*, natomiast *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Thermoactinomyces*, *Lactobacillus* i *Lactococcus* uczestniczyły w syntezie estrów, fenoli, alkanów oraz związków zawierających azot i siarczki. Ponadto, *Pseudomonas*, *Enterobacter* korelowały z wiekszością zidentyfikowanych związków aromatycznych i przyczyniały się do wzbogacenia smaku i aromatu wina [49].

Podobne zależności sukcesji mikrobioty fermentacyjnej i dynamiki szlaków metabolicznych w oparciu o technologię HTS i metabolomikę, wykazano w trakcie procesu fermentacji chińskiego wina ryżowego Wuyi Hong Qu [31, 32]. Bakterie *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Raoultella*, *Staphylococcus, Pediococcus* i *Weissella* oraz grzyby należące do *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Rhizopus*, *Monascus*, *Pichia*, *Wickerhaamomyces*, *Candida* i *Aspergillus* zostały zidentyfikowane jako dominująca mikrobiota fermentacyjna wina. Dynamika mikrobiologiczna wykazała, że skład taksonomiczny mikrobioty zmniejszał się wraz z postępującym procesem fermentacji z sukcesywną dominacją *Lactobacillus* i *S. cerevisiae* w końcowej fazie procesu [31]. Ponadto analiza współwystępowania ujawniła korzystne i antagonistyczne relacje pomiędzy różnymi rodzajami lub gatunkami drobnoustrojów. Bakterie kwasowe, w tym *Gluconacetobacter* spp., *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus alimentarius*, i *Lactococcus pisicium* okazały się prawie antagonistyczne dla *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* i *Brevibacillus* spp. Natomiast, korelacja pomiędzy bakteriami a grzybami wykazała, że *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Weissella confused*, *Lactobacillus brevis* i *Pediococcus pentosaceus* korzystnie współwystępowały z *Candida ploysorbophila*, *Candida glabrata*, *Meyerozym guilliermondii* i *Rhizopus oryzae*. Trzy rodzaje bakterii, a mianowicie *Gluconacetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* oraz trzy rodzaje grzybów *Pichia*, *Wickerhamomyces* i *Saccharomyces*, zostały określone jako podstawowe mikroorganizmy funkcjonalne w produkcji lotnych metabolitów wtórnych (estry, alkohole, lotne kwasy), skorelowanych z poprawą jakości aromatycznej Wuyi Hong Qu [32].

Zintegrowane podejście „food-omics" zostało również wykorzystane do analizy profilu sukcesji i aktywności metabolicznej mikrobioty, tradycyjnej chińskiej herbaty Pu-erh, wytwarzanej z liści drzewa herbacianego *Camellia sinensis* i *Camellia assamica*, wyłącznie w prowincji Yunnan [47, 97]. Rola herbaty Pu-erh jako napoju przeciwutleniającego, przeciwnowotworowego, o właściwościach hipolipidemicznych, zmniejszającym toksyczność oraz wspomagającym trawienie, jest dobrze znana [6]. W przeciwieństwie do najczęściej spożywanej czarnej herbaty, która powstaje w procesie utlenienie katechin, herbata Pu-erh wytwarzana jest poprzez spontaniczną fermentację drobnoustrojową i staje się coraz bardziej popularna w Europie i Stanach Zjednoczonych [47]. Przetwarzanie surowej herbaty Pu-erh obejmuje naturalne wysychanie, prażenie, walcowanie, suszenie na słońcu i prasowanie [100]. Liście Pu-erh są następnie poddawane starzeniu w celu promowania naturalnej, stałej fermentacji substratu. Przetwarzanie dojrzałej herbaty zwykle obejmuje dodatkowy etap zwany palowaniem (kompostowaniem) wykonywanym przed suszeniem w celu ułatwienia procesu starzenia. Etap ten zwany fermentacją w stanie stałym, obejmuje obróbkę liści w ciepłym i wilgotnym środowisku trwającą około 65 dni, a szczególny smak i właściwości herbaty wynikają ze złożonych interakcji mikrobiologicznych i procesu utleniania [95]. Analiza metagenomiczna wykazała, że dominującymi taksonami bakteryjnymi podczas 30 dniowego procesu fermentacji Pu-erh były *Proteobacteria* (48,42%), *Firmicute* (19,91%), *Actinobacteria* (16,91%), *Sinicobacteria* (9,95%) i *Bacteroidetes* (3,79%), a najczęściej obserwowane taksony grzybowe należały do rodzaju *Aspergillus*, *Debaryomyces, Rasamsonia* i *Thermomyces* [95]. Wśród *Proteobacteria* dominowały *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter* oraz *Klebsiella*. W porównaniu ze społecznością grzybów, względna liczebność bakterii (27–37%) w trakcie spontanicznej fermentacji Pu-erh była niższa w porównaniu do mikroorganizmów eukariotycznych (48–55%). Sieci genów 16S i ITS wykazały, że bakterie i grzyby wykluczają się wzajemnie, np.: *Bacillaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Comamonadaceae* wykazywały ujemną korelację z grzybami *Aspergillus*, *Rasamsonia*, *Panicillium*, *Debaryomyces* i *Saccharomycetes* [99]. Większość białek sklasyfikowanych w oparciu o profilowanie metaproteomu (MALDI-TOF MS) stanowiły oksydoreduktazy, transferazy, dehydrogenazy, peroksydazy, metylotransferazy, hydrolazy, które zostały przypisane do *Proteobacteria* (75%) i Ascomycota (96,6%). Szlaki funkcjonalne zostały również powiązane z metabolizmem aminokwasów, biosyntezą metabolitów wtórnych czy metabolizmem węglowodanów. Wykazano, że specyficzny aromat oraz unikalna jakość smakowa herbaty Pu-erh, jest istotnie

skorelowana z różnorodnością i aktywnością mikrobiologiczną, zarówno mikrobioty bakteryjnej jak i grzybowej podczas poszczególnych etapów fermentacji [47]. Analiza metabolomiczna wykazała, że polifenole, pigmenty herbaciane i alkaloidy są w dużej mierze syntezowane podczas fermentacji w wyniku zwiększonej aktywności peroksydazy, oksydazy i lakazy. Rodzaj *Aspergillus* był funkcjonalnym taksonem odpowiedzialnym za ich biokonwersję na wczesnych etapach fermentacji, podczas gdy *Bacillus*, *Rasamsonia*, *Lichtheimia* i *Debaryomyces* katalizowały szereg reakcji związanych z powstawaniem aromatu w późnym stadium dojrzałej fermentacji Pu-erh. Analiza sieci interakcji biologicznych, wykazała wzrost ekspresji szlaków skorelowanych z jakością zapachu herbaty, w tym związanych z biotransformacją karwonu oraz pochodnych kwasu fenolowego. Wysoki poziom ekspresji metylotransferazy był istotnie skorelowany z *Pseudomonas* (49,34%) i *Aspergillus* (43,35%) na wczesnym etapie fermentacji. Ponadto, badania w oparciu o analizy metabolomu wykazały, że zawartość kofeiny w liściach fermentowanej herbaty zmniejsza się około 30% podczas biodegradacji w teofilinę, katalizowanej z udziałem *Aspergillus niger*, *Aspergillus sydowii*, *Candida albicans*, *Candida famata* i *Pseudomonas* sp. [98].

Funkcjonalne analizy metagenomiczne ujawniły również nowy wgląd w dynamikę mikrobiologiczną, różnorodność i interakcje mikrobioty biorącej udział w procesie fermentacji ziarna kakaowego [33]. W szczególności wykryto obecność rzadkich taksonów obejmujących oportunistyczne gatunki, tj. *Erwinia tasmaniensis*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *Oenococcus oeni* oraz społeczności fagowe *Myoviridae* i *Siphoviridae* przypisane do sekwencji *Lactobacillus* i *Enterobacter*. Dzięki rekonstrukcji szlaków metabolicznych wykazano dominujący udział LAB, w tym *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus plantarum* w heterolaktycznej fermentacji i szlaku asymilacji cytrynianu. Rola Enterobacteriaceae w konwersji substratów została wykazana poprzez obecność genów kodujących enzymy szlaku syntezy mleczanu, octanu, etanolu oraz detoksykacji metyloglikosalu. Ponadto wyniki badań potwierdziły kluczową rolę utleniającego etanol *Acetobacter pasteurianus*, umożliwiając przyszłą ukierunkowaną selekcję współistniejących szczepów jako funkcjonalne kultury starterowe do kontrolowanych procesów fermentacji ziaren kakaowych.

Na skalę przemysłową, technologia HTS w oparciu o sekwencjonowanie amplikonu 16S i 18S rDNA została wykorzystana w celu zoptymalizowania i kontroli procesu fermentacji Kombucha, azjatyckiego fermentowanego napoju na bazie zielonej i czarnej herbaty [11]. Obecnie ten naturalnie musujący napój stał się popularny w Europie i Ameryce Północnej, jako suplement wykazujący właściwości zdrowotne (detoksykacja, przeciwnowotworowe), które mogą pochodzić z samej herbaty lub metabolitów wytwarzanych przez mikrobiotę podczas procesu fermentacji [7]. Pomimo zarzutów kampanii marketingowych dotyczących bezpieczeństwa mikrobiologicznego Kombucha, w literaturze wciąż brakuje badań potwierdzających właściwości zdrowotne tego produktu. Tradycyjnie uzyskiwany przez fermentacje słodzonej czarnej lub zielonej herbaty (8–12 dni w warunkach tlenowych i statycznych) w obecności rdzennej społeczności mikroorganizmów tworzących naturalny pływający celulozowy biofilm, zwany „błonką", produkt końcowy jest szczególnie bogaty w kwasy organiczne i CO_2; każda fermentacja prowadzi do nowej warstwy biofilmu, która jest wykorzystywana do przyszłych fermentacji jako starter [56]. Mikrobiologiczną dynamikę zmian monitorowano zarówno w oparciu o fermentację czarnej i zielonej herbaty oraz biofilmu [11]. Dominujące rodzaje bakterii należały do *Acetobacteraceae* i w mniejszym stopniu do *Lactobacteriaceae*, podczas gdy główne drożdże sklasyfikowano do *Dekkera*, *Hanseniaspora* i *Zygosaccharomyces*. *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconobacter oxydans* i *Acetobacter peroxydans* reprezentowały gatunki dominujące, a *Oenococcus oeni*, był silnie skorelowany z fermentacją zielonej herbaty. Zaobserwowano, że kinetyka wzrostu jest bardzo podobna dla wszystkich grup mikroorganizmów, zarówno w fermentacji Kombucha czarnej, jak i zielonej herbaty, ale z wyższymi wartościami w porównaniu do stabilnego biofilmu.

Fermentowane produkty na bazie roślinnej

Technologie „food-omics" okazały się potężnym narzędziem do badania złożonej mikrobioty środowiskowej i śledzenia procesów fermentacji azjatyckiej żywności pochodzenia roślinnego, tj. pasty sojowe [84], tofu [23], Kinema [42] czy Kimchi [36]. Produkty te należą do tradycyjnych fermentowanych produktów, powstających w spontanicznej fermentacji z użyciem naturalnych kultur starterowych o złożonych kompozycjach mikrobiologicznych. Spożywane jako dodatek do warzyw, ryb, mięs lub jako składnik przyprawowy cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na obecność różnych prozdrowotnych związków bioaktywnych wytwarzanych podczas procesu ich fermentacji. Rosnące zainteresowanie produktami pochodzenia roślinnego na których oparta jest dieta wegańska spowodowała intensyfikację technik „omics" w kierunku poznania funkcjonalnej roli mikrobioty fermentacyjnej i jej interakcji w generowaniu unikalnych walorów smakowych i aromatycznych oraz ich właściwości zdrowotnych.

Społeczność bakteryjna „meju" koreańskiego produktu fermentowanego pochodzącego z soi, została scharakteryzowana w jednym z pierwszych badań ekologii mikrobiologicznej żywności przy zastosowaniu podejścia 16S rDNA [41]. Meju przypominające

japońskie „natto" i „miso" oraz indonezyjskie „tempeh" jest podstawą wielu azjatyckich produktów, w których sfermentowane pasty sojowe miesza się z przyprawami, warzywami i ryżem, np.: Cheonggukjang [63], Doenjang [61] i Kochjang [62]. Analiza populacji bakteryjnej z wykorzystaniem 16S rDNA dla wszystkich trzech produktów wykazała ogólna dominację *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*), a następnie *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*), *Lactobacillus* spp. oraz gatunki innych rodzajów LAB (*Leuconostoc*, *Weissella*, *Tetragenococcus*). Ponadto, podczas fermentacji Doenjang, *Lactobacillus* był istotnie skorelowany ze wzrostem kwasu γ-aminomasłowego (GABA), natomiast *Tetragenococcus* dominował w fazie wzrostu mleczanu, octanu, putrescyny i tyraminy [37]. Przypuszcza się, że *Tetragenococcus* może być przede wszystkim odpowiedzialny za produkcję kwasów organicznych i amin biogennych.

Innym koreańskim produktem, który był aktywnie badany, jest Kimchi [36, 39]. W fermentacji Kimchi sekwencjonowanie metagenomu ujawniło zaangażowanie złożonej kohorty bakteryjnej i zmianę ekspresji genów na różnych etapach fermentacji. Dominującą populacją metagenomu podczas procesu fermentacji Kimchi były *Proteobacteriae* i *Firmicute*. Ponadto, skład ilościowy mikrobioty zmieniał się podczas poszczególnych etapów fermentacji; we wczesnej fazie fermentacji dominowały *Enterobacter*, *Vibrio* i *Pseudomonas*, podczas gdy *Lactobacillus*, *Weissella* i *Leuconostoc* stanowiły dominującą mikrobiotę na późniejszych etapach procesu [36]. Ponadto analiza oparta na RNA-seq ujawniła, że geny związane z wytwarzaniem smaku były kodowane przez *L. mesenteroides* na początkowych etapach procesu fermentacji, co sugeruje, że gatunek ten może odgrywać znaczącą rolę w procesie kształtowania się pożądanych cech organoleptycznych. Profile ekspresji genów wskazywały zmniejszenie metabolizmu białek w czasie, w połączeniu ze wzrostem syntezy witamin, tolerancji na stres i metabolizmu węglowodanów, szczególnie szlaków fermentacji kwasu mlekowego. Kwantyfikacja metabolitów tworzonych podczas fermentacji Kimchi wykazała, że wzrost mleczanu, octanu i etanolu we wczesnej fazie fermentacji był istotnie skorelowany z aktywnością metaboliczną LAB, które również były dominującymi producentami mannitolu.

Ciekawe wyniki, w oparciu o zintegrowane analizy metagenomiczne i metabolomiczne zostały opublikowane w przypadku fermentowanych produktów sojowych, tj. sufu [85], Kinema [42] i sos sojowy [84]. W oparciu o WMS przeanalizowano profil sukcesji i potencjału funkcjonalnego metagenomu pasty sojowej Kinema, otrzymywanej w procesie spontanicznej fermentacji gotowanych żółtych nasion soi [42]. Analiza społeczności bakteryjnej wykazała, że *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Corynobacterium glutamicum*, *Bacillus pumilus* i *L. lactis* były dominującymi gatunkami, a ich różnorodność wahała się nieznacznie w całym okresie fermentacji, wskazując na aktywne występowanie sukcesji bakteryjnej. Ponadto, wykryto obecność patogennych gatunków *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus penneri*, *E. faecalis* i *Staphylococcus saprophyticus*, których liczebność zmieniała się w zależności od pory roku. Funkcjonalne profilowanie metagenomu ujawniło obecność genów biorących udział w metabolizmie alaniny, glutaminianu, argininy, proliny, powiązanych z biosyntezą związków aromatycznych w trakcie fermentacji. Geny sklasyfikowane do *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Streptococcus* były istotnie skorelowane z metabolizmem kofaktorów witamin, niezbędnych do funkcjonowania enzymów i metabolizmu komórkowego, które ostatecznie poprawiają jakość odżywczą fermentowanego produktu. Większość enzymów metabolizmu węglowodanów (hydrolazy, glikozylotransferazy, esterazy) przypisanych do *Firmicutes* (91,29%), *Actinobacteria* (7,41%) i *Proteobacteria* (3,75%), było zaangażowane w biosyntezę disacharydów, oligosacharydów oraz degradację hemicelulozy, polisacharydów i pektyn. Ponadto, rekonstrukcja szlaków metabolicznych wykazała obecność biokatalizatorów, prawdopodobnie zaangażowanych w transformację polimerów białkowych i węglowodanowych w bioaktywne cząsteczki o korzystnych prozdrowotnych właściwościach. W genomie *Enterococcus* sp., *B. cereus*, *Lactobacillus lactis* i *Carnobacterium maltaromaticum* zidentyfikowano geny kilku pożądanych enzymów, tj. β-galaktozydaza, β-glukozydaza, β-ksylozydaza i dekarboksylaza glutaminianowa. Katalityczna funkcja dekarboksylazy glutaminianowej została potwierdzona dla biosyntezy kwasu γ-aminomasłowego (GABA) [42]. Ponadto, w zacierach sosu sojowego, szlaki genowe *Enterococcus*, *Pediococcus* były dodatnio skorelowane z obecnością fosfofruktokinazy, kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej, kluczowych enzymów szlaku produkcji kwasu mlekowego [84].

Sufu, zwany także „serem orientalnym" jest produktem fermentacji soi, który w zależności od szczepu zastosowanego jako starter oraz koloru i smaku jest klasyfikowany jako czerwone i białe sufu [85]. Analizy w oparciu o 16S rDNA wykazały, że *Lactococcus, Actinobacter*, *Tetragenococcus*, *Pseudomonas* i *Lactobacillus* były dominującymi bakteriami i kluczowymi czynnikami podczas fermentacji sufu, lecz profile taksonomiczne różniły się między handlowym czerwonym, a białym sufu. W szczególności *Lactococcus*, *Streptococcaceae* i *Lactobacillales* dominowały w próbkach czerwonego sufu, podczas gdy *Enterococcus*, *Tetragenococcus* i *Bacillales* były powszechne w próbkach białego. Profile metabolomiczne fermentacji sufu, wykazały dodatnią korelację *Lactococcus* z produkcją

lotnych związków smakowych (etanol, octan etylu, benzaldehyd) oraz kwasów organicznych (mrówkowy, jabłkowy). *Tetragenococcus* i *Comamonas* były istotnie skorelowane ze szlakiem syntezy i transformacji aminokwasów, a *Streptococcaceae* i *Moraxellaceae* promowały wzrost stężenia kwasu mrówkowego. Ponadto, *Moraxellaceae* reprezentowany głównie przez *Actinobacter* był pozytywnie powiązany z metabolitami smakowymi, szczególnie estrami [85].

Analizy 16S rDNA zastosowano również do prześledzenia struktury mikrobioty sfermentowanych oliwek stołowych w stylu hiszpańskim i greckim [9]. Fermentacja w stylu greckim obejmuje naturalne, nieprzetworzone oliwki, które są bezpośrednio solone po zbiorach; fermentacja w stylu hiszpańskim obejmuje poprzedni etap mycia owoców rozcieńczonych roztworem NaOH (2–3%). Początkowy etap fermentacji, zarówno greckiej, jak i hiszpańskiej charakteryzował się wysokim poziomem halofilnych bakterii *Chromohalobacter* i *Halomonas*, *Marinilactibacillus*, które stanowiły około 60% całkowitej populacji bakterii, podczas gdy pod koniec procesu fermentacji *Lactobacillus* reprezentował główną populację bakteryjną obecną na powierzchni oliwek. Wśród *Lactobacillus* dominujące gatunki stanowiły *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus pentosus*, podczas gdy *Chromohalobacter salarius* i *Marinilactibacillus piezotolerans* zidentyfikowano wśród rodzajów halofilnych. Fermentacja w stylu hiszpańskim była związana z większą liczbą Enterobacteriaceae, takich jak *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* i *Klebsiella*. Różnice te mogą tłumaczyć szczególne właściwości bezpieczeństwa i zachowania tych dwóch form fermentowanych surowców.

Analizy metagenomiczne wykorzystano również w prześledzeniu procesów fermentacji zakwasów piekarskich, które od bardzo dawna odgrywają istotna rolę w produkcji żywności opartej na bazie mąki. Zakwas jest szeroko stosowany jako starter do wyrobu chleba w całej Europie [29], a także jako idealne inokolum w wytwarzaniu chińskiego chleba na parze [93]. W technologii chleba ocena różnorodności, struktury i dynamiki populacji mikroorganizmów jest zwykle przeprowadzana podczas procesu fermentacji zakwasu. Stabilne ekosystemy zakwasów mogą być zamieszkałe przez proste lub bardzo złożone konsorcja reprezentowane przez różne gatunki LAB i drożdże [18, 29]. Najbardziej rozpowszechnione gatunki LAB należą do rodzajów *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Weissella*, podczas gdy reprezentujące gatunki drożdży należą do kladów *Kazachstanstania* i *Saccharomyces* [17]. Procesy fermentacyjne poprawiające jakość powstałego produktu pod względem tekstury, smaku, wartości odżywczej oraz wydłużenia okresu przydatności do spożycia są ściśle związane ze stabilnością i aktywnością metaboliczną mikrobioty spontanicznych zakwasów.

Szeroko zakrojone analizy w oparciu o 16S rDNA i ITS mikrobioty spontanicznych zakwasów wykazały, że na bioróżnorodność i stabilność konsorcjum zakwasów mają wpływ mikrobiologiczny i chemiczny skład surowców, interakcje między populacjami mikroorganizmów oraz różne parametry fermentacji, w tym temperatura, wielkość inokulum, wydajność ciasta i czas fermentacji [51]. Badania mające na celu prześledzenie dynamiki zmian mikrobioty podczas 72 h procesu fermentacji, wykazały wysokie tempo zmienności w obrębie struktury taksonomicznej populacji drożdży i bakterii. Ponadto, dynamika społeczności mikroorganizmów w spontanicznie rozpoczynających się zakwasach wykazała, że konsorcjum zakwasów osiąga stabilizację poprzez trójfazową ewolucję, charakteryzującą się przewagą nietypowych LAB, typowych LAB i wysoce dostosowanych LAB zakwasów [58]. W oparciu o meta-analizę 583 zakwasów, uwzględniającą zarówno warunki procesu jak i różnorodność mikrobioty wykazano, że najbardziej rozpowszechnioną grupę bakterii w zakwasach były LAB reprezentowane przez *Lactobacillus sanfranciscensis* (47%) oraz *Lactobacillus plantarum* (44%) [87]. Spontaniczna fermentacja na bazie trzech rodzajów mąki (orkiszowa, pszenna, żytnia) wykazała, że dominującą populacją we wszystkich rodzajach zakwasów po 72 h fermentacji były *Firmicutes*, reprezentowane wyłącznie przez Lactobacillales, a dwa pozostałe i mniej liczne typy bakterii stanowiły Proteobacteria i Bacteroidetes. Po 24 h fermentacji zakwasu żytniego dominującym rodzajem był *Weissella* sp., który na dalszych etapach procesu fermentacji został zdominowany przez *Lactobacillus*, podobnie jak w pszenicy i zakwasie orkiszowym. *Lactobacillus* dominował we wszystkich zakwasach po 72 h fermentacji [4]. Analiza metagenomiczna różnorodność LAB i drożdży tradycyjnych zakwasów z zachodniego regionu Mongolii wykazała, że dominującymi gatunkami populacji mikroorganizmów były *Lactobacillus plantarum* i *S. cerevisiae* [93], podczas gdy Liu in. [51] wykazał, że kluczowym gatunkiem LAB chińskich zakwasów był *Lactobacillus sanfranciscensis*. W sumie, meta-analiza wykazała, że ponad 90% opisanych bakterii w zakwasach należało do LAB, reprezentujących 24 gatunki, z czego 17 z nich stanowiły pałeczki kwasu mlekowego.

Fermentowane produkty na bazie mięsa i owoców morza

Kolejnym obszarem szerokiego wykorzystania badań z zakresu metagenomiki jest sektor przemysłu mięsnego. Badania koncentrują się głównie na określeniu składu gatunkowego mikrobiomu kiełbas. Przeprowadzono kilka niezależnych badań w oparciu o analizy 16S rDNA, dotyczących określenia składu taksonomicznego oraz dynamiki zmian mikrobioty w fermentowanych produktach mięsnych [69, 73]. Wyka-

zano, że ponad 30 różnych rodzajów *Staphylococcaceae* i *Lactobacillaceae* jest obecnych podczas dojrzewania sfermentowanych kiełbas, z dominacją *Lactobacillus sakei* podczas spontanicznej fermentacji, jak również innych bakterii, tj. *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *S. xylosus* i *Staphylococcus succinus* [30]. Rozwój koagulozoujemnych *Staphylococcus* i *Kocuria* podczas fermentacji prowadzi do proteolizy i lipolizy mięsa, podczas gdy *Lactobacillus* są odpowiedzialne za spadek pH, produkcję kwasu mlekowego oraz wytwarzanie niewielkich ilości kwasu octowego, etanolu, acetoiny, dwutlenku węgla i kwasu pirogronowego [73].

Podejście metagenomowe w połączeniu z analizami metabolicznymi zostało wykorzystane do prześledzenia etapów spontanicznej i inokulowanej fermentacji tradycyjnych włoskich kiełbas [25]. Skład taksonomiczny mikrobioty kiełbas podczas inokulowanej fermentacji wykazał dominację *L. sakei* i *S. xylosus*, jako kultur starterowych oraz spadek proporcji *Lactibacillus curvatus*, *Staphylococcus equorum* i *Actinobacter* sp. Wzrost dominacji *L. sakei* był istotnie skorelowany z szybszym tempem zużycia substratów fermentacyjnych, obniżeniem pH oraz wzrostem ilości kwasu octowego i związanego z nim zapachu (ostry, kwaśny, serowy, octowy) obniżającego walory organoleptyczne produktu. Podczas fermentacji spontanicznej kiełbas, najliczniejszą grupę metagenomu stanowiły *L. sakei* (56%) i *L. curvatus* (20%) oraz szereg mniej licznych taksonów zidentyfikowanych jako *S. xylosus*, *Leuconostoc* sp., *L. lactis*, a także *Actinobacterium*, *Pseudomonas* i *Priopionibacterium*. Rdzenna mikrobiota spontanicznie fermentowanych kiełbas charakteryzowała się obecnością genów szlaku biosyntezy *ex novo* kwasów tłuszczowych, syntezowanych z metabolizmu pirogronianów i aminokwasów. Zgodnie z tym, podwyższony poziom estrów o długich łańcuchach, tj. oktonian etylu i dekanonian pod koniec procesu dojrzewania był pozytywnie skorelowany z owocowym i słodkim zapachem kiełbas [25].

Fermentowane owoce morza zwane Jeotgal są powszechnie spożywane w Azji zwłaszcza w Korei Południowej. Do niedawna różnorodność mikrobiologiczna fermentowanych produktów z owoców morza pozostawała w przeważającej mierze nie opisana. NGS oraz analizy taksonomiczne w oparciu o 16S rDNA i ITS umożliwiły identyfikację metagenomu krewetek, mątw czy krabów [39]. We wszystkich analizowanych produktach zidentyfikowano dwa rodzaje bakterii z grupy LAB, *Lactobacillus* i *Weissella*, które były obecne w różnych proporcjach w zależności od rozpatrywanego produktu. Tylko w jednym produkcie, opartym na fermentacji ostryg dominującą mikrobiotą była halofilna bakteria *Salinivibri*, stanowiąca 89% analizowanego metagenomu [43]. Badania te, są sprzeczne z wynikami Jung i in. [36], w których wykazano, że w Saeu-jot (jeotgal oparty na fermentacji krewetek) LAB stanowiły niewielką populację oraz były stabilne podczas całego procesu fermentacji. W początkowym etapach fermentacji krewetek dominowały *Proteobacteriae* (*Photobacterium, Vibrio*), które na dalszych etapach procesu fermentacji zostały zdominowane przez *Firmicutes*, tj. *Staphylococcus*, i *Alcalibacillus* oraz *Halanaerobium*. Co ciekawe, analizy metagenomu doprowadziły również do stwierdzenia, że szeroko rozpowszechnioną bakterią w koreańskich sfermentowanych produktach z owoców morza są *Archaebacteriae*.

W oparciu o 16S rDNA wykazano dynamiczną sukcesję społeczności bakteryjnej oraz ich korelacji z jakością fermentowanego chińskiego sosu rybnego [19]. Tworzenie unikalnych smaków i składników odżywczych sosu było ściśle powiązane z aktywnością mikrobioty fermentacyjnej. Dominującą biotą bakteryjną fermentacji sosu rybnego były *Firmicutes* (*Halanaerobium*, *Bacillus*, *Tetragenococcus*) i *Proteobacteria*, głównie tym *Shewanella*, a różnorodność i bogactwo społeczności bakteryjnej stopniowo rosło wraz z wydłużeniem czasu fermentacji. Na poziomie typu *Proteobacteria* wykazywała tendencję wczesnego spadku, a później wzrostu, podczas gdy *Firmicutes* wykazywały tendencję odwrotną. Wiele innych rodzajów bakterii, w tym *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Tissierella*, *Carnobacterium* i *Gallicola* zostało sklasyfikowanych na późnym etapie fermentacji. *Halanaerobium* był dodatnio skorelowany z produkcją trimetyloaminy, natomiast *Tetragenococcus* wykazał nie tylko potencjał do produkcji kwasu, ale również do redukcji szkodliwych substancji, takich jak amoniak i aminy.

3.2. Monitorowanie warunków przechowywania żywności

Większość badań w oparciu o technologie „omics" koncentruje się na dynamice mikrobioty żywności, ale niewiele wiadomo na temat zmienności produkcji partii i zmian mikrobiologicznych zachodzących podczas przechowywania. W celu wydłużenia okresu trwałości wielu łatwo psujących się produktów spożywczych w przemyśle stosuje się różne metody przedłużania ich trwałości, tj. chłodzenie, pakowanie próżniowe, pakowanie w modyfikowanej atmosferze, dodatek nizyny [24]. Wiadomo, że mikrobiota produktów spożywczych ulega znacznej zmianie składu gatunkowego i ilościowego pod wpływem modyfikacji temperatury, pH oraz stężeń NaCl a wahania w składzie mikrobiomu mają istotny wpływ na końcową jakość uzyskiwanego produktu [6]. Przechowywanie w warunkach chłodniczych jest powszechnym podejściem umożliwiającym zachowanie świeżości i wartości odżywczych żywności. Jednak zastosowanie niskich temperatur, opakowań i środków przeciwdrobnoustrojowych może mieć wpływ na sukcesję i aktywność metaboliczną „efemerycznych

mikroorganizmów powodujących psucie" (ESO), a ich rzeczywisty wkład w psucie zależy w dużej mierze od warunków przechowywania. Narzędzia metagenomiczne mogą poprawić zrozumienie ekologii mikrobiologicznej linii przetwarzania żywności [39]. Producenci żywności będą mogli zweryfikować lub usprawnić bieżące zarządzanie zagrożeniami mikrobiologicznymi, wykorzystując podejście metagenomiczne do monitorowania zarówno liczebności jak i aktywności metabolomicznej mikrobioty w celu zaplanowania odpowiednich warunków przetwarzania i przechowywania produktów żywnościowych.

W oparciu o 16S rDNA wykazano, że długotrwałe chłodzenie istotnie zwiększyło skład gatunkowy *Pseudomonas* i *Enterobacteriaceae* w analizowanym metagenomie szpinaku [54]. Podobne obserwacje wykazano dla przechowywanych w chłodni steków wołowych, w których analiza 16S rDNA wykazała istotną korelację zmniejszenia różnorodności naturalnej mikrobioty bakteryjnej i wzrostu gatunków bakterii odpowiedzialnych za psucie, w tym *Pseudomonas* i *Brochothrix thermosphacta* [13]. Ponadto, analiza ITS w oparciu o 18S rDNA wykazała, zróżnicowanie taksonomiczne populacji grzybów podczas przechowywania w chłodni zbiorów jabłek [78] oraz sałaty [44]. W porównaniu z próbkami z punktu skupu, jabłka przechowywane w chłodni wykazały wzrost względnej liczebności kilku rodzajów grzybów, w szczególności *Aspergillus*, *Botrytis*, *Mucor* i *Penicillium*.

Podejście metagenomiczne poprzez precyzyjne sklasyfikowanie społeczności mikrobiologicznej zostało wykorzystane do opracowania strategii eliminowania wad produktów spożywczych związanych z obecnością mikrobioty ESO [20]. Połączone analizy WMS oraz 16S rDNA umożliwiły identyfikację termofilnej bakterii *Thermus thermophilus*, będącej przyczyną defektu serów, tzw. różowego przebarwienia [71]. Dogłębna analiza genomu *T. thermophilus* ujawniła obecność genów biorących udział w biosyntezie karotenoidów, w tym genów odpowiedzialnych za syntezę likopenu (*crtB* i *crtI*). Ponadto, analiza WMS chińskiego wina ryżowego ujawniła, że *L. brevis* koduje geny potencjalnie zaangażowane w psucie, w tym geny związane z syntezą biotyny, fermentacją malolaktyczną i wytwarzaniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Ponadto, przy użyciu sekwencjonowania 16S rDNA wykazano, że bakterie *Leuconostoc gasicomitatum* są odpowiedzialne za psucie się marynowanych produktów drobiowych, a proces marynowania istotnie zmniejszył udział *B. thermosphacta* oraz gatunków *Clostridium* i *Enterobacteriaceae* w analizowanej próbce [13]. W innych badaniach, wykazano, że zmniejszenie soli w mięsie przeznaczonym na kiełbasy zmniejsza bioróżnorodność mikrobioty bakteryjnej, co przyczynia się do szybszego psucia produktu. Dzięki wyższym stężeniom NaCl wraz z połączeniem pakowania próżniowego wykazano zwiększoną liczebność subpopulacji *Enterococcaceae* i *Leuconostocaceae* skorelowaną z wydłużeniem okresu trwałości kiełbas [27]. Ponadto, analiza 16S rDNA wykazała, że zastosowanie nizyny jako środka konserwującego istotnie hamuje wzrost *Kocuria rizophila*, *S. xylosus*, *L. carnosum* i *Carnobacterium divergens* powodujących psucie chłodzonych ryb i produktów mięsnych [24]. W jednym przypadku technologię WGS wykorzystano do identyfikacji patogenów przenoszonych przez żywność w mikrobiomie łańcucha produkcji wołowiny [91]. Chociaż przetwarzanie produktu zmniejszyło całkowitą liczbę bakterii w mięsie, zauważono, że spowodowało wzrost względnej liczebności *Salmonella enterica*, *E. coli* i *Clostridium botulinum*, potencjalnie ze względu na ich zdolność do przetrwania interwencji przeciwbakteryjnych [91].

3.3. Monitorowanie bezpieczeństwa żywności

Ze względu na środowisko produkcji żywności i zagrożeń spowodowanych skażeniami, wdrożenie analiz metagenomicznych umożliwi identyfikację i monitorowanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych żywności, w tym świadomych i biologicznych strategii kontroli patogenów w środowisku łańcucha pokarmowego [5, 45]. Źródło skażeń mikrobiologicznych w przemyśle spożywczym, to przede wszystkim mikrobiota pierwotna produktów zwierzęcych i roślinnych (mięso, jaja, mleko, warzywa, owoce), mikrobiota surowców dodatkowych (cukier, przyprawy, sól), mikrobiota środowisk urządzeń i higiena personelu produkcyjnego. Żywność jest źródłem składników odżywczych dla człowieka, ale również idealnym środowiskiem rozwoju wielu mikroorganizmów. Część z tych drobnoustrojów to mikroorganizmy charakterystyczne dla danego produktu (saprofityczne), które stanowią mikrobiotę rodzimą oraz naniesioną, pochodzącą ze środowiska zewnętrznego. Mikrobiota ta powoduje pogorszenie cech smakowych lub zapachowych produktu, jego struktury, konsystencji i barwy oraz obniżenie wartości odżywczej. Drugą grupę stanowią mikroorganizmy chorobotwórcze (patogeny), wywołujące zatrucia i zakażenia pokarmowe. Podejście w oparciu o WMS umożliwia identyfikację patogenów żywności o określonych cechach wirulencji. Na przykład, stosując wysokoprzepustowe sekwencjonowanie metagenomu (WMS) szpinaku zidentyfikowano szczep *E. coli* produkujący toksynę Shiga [45] oraz sklasyfikowano genom (WGS) patogennej *Listeria* monocytogenes wyizolowanej z mikrobiomu lodów [65]. Testy oparte o analizy WMS umożliwiły również identyfikację, pochodzenie i wzorzec dystrybucji genów kodujących oporność na antybiotyki w wielu różnych środowiskach, tj. zwierzęta, obornik, zbiorniki wodne czy gleba [68]. Stosowanie antybiotyków w produkcji zwierzęcej spo-

wodowało rozprzestrzenianie się w środowisku genów oporności na antybiotyki, szczególnie ludzkich patogenów, które mogą być obecne w łańcuchu produkcji żywności [64]. Na przykład, Maury i wsp. [57] w oparciu o RNA-seq zidentyfikowali dodatkowe nowe czynniki zjadliwości *L. monocytogenes*, porównując genom szczepów klinicznych i szczepów związanych z żywnością. Szeroko zakrojone badania ognisk skażenia żywności dotyczą identyfikacji patogenów tj., *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* czy *Clostridium botulinum* [15]. Analizy metagenomowe zostały wykorzystane do zbadania wpływu leczenia antybiotykami na profil mikrobiomu trzody chlewnej, dla której wykazano przesunięcie filotypów bakteryjnych spowodowane wzrostem *E. coli* [53]. Natomiast, badania wykonano dla mikrobiomu kurcząt po kuracji penicylinowej, wykazały przesunięcia mikrobioty jelitowej w kierunku wzrostu *Firmicutes* i zmniejszenia udziału *Bacteroides*; podobne zależności w dysbiozie mikrobioty jelitowej zaobserwowano wśród ludzi otyłych [79]. Analogicznie, proteomika została również dobrze udokumentowana, aby zapewnić cenne podejście do wykrywania i identyfikacji patogenów przenoszonych przez żywność. Analiza w oparciu o MALDI-TOF MS z powodzeniem została wykorzystana do scharakteryzowania różnych podtypów *E. coli* [22] oraz *L. monocytogenes* bezpośrednio z selektywnie wzbogaconego bulionu [34]. W innym badaniu, Gilquin i wsp. [28] zastosowali test proteomiczny do wykrywania pięciu patogenów w żywności, w tym *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *Shigella dysenteriae* oraz *E. coli* i *Campylobacter jejuni*. Wyniki badań proteomicznych mogą stanowić ogromne wsparcie w zrozumienie mechanizmów oporności na antybiotyki i tworzenie biofilmów patogenów pokarmowych.

Analizy metagenomiczne mogą znaleźć zastosowanie do badań na różnych etapach łańcucha produkcyjnego lub w różnych obszarach zakładu produkcyjnego, w których konieczne jest podjęcie działań zmierzających do poprawy stosowanych praktyk higienicznych. Zakłady produkcyjne można postrzegać jako swego rodzaju ekosystemy mikrobiologiczne, gdzie konieczne jest regularne monitorowanie miejsc szczególnie narażonych na występowanie siedlisk mikroorganizmów lub źródła ich potencjalnego skażenia. Drobnoustroje w zakładach przetwórczych występują najczęściej w zorganizowanych, przytwierdzonych do podłoża skupiskach, zwanych biofilmem. Dzięki takiej organizacji bakterie zyskując odporność na środki czyszczące i dezynfekujące, mogą stanowić źródło skażenia środowiska produkcyjnego i zanieczyszczenia produktów żywności [5]. Ponadto, podkreśla się, że środowisko produkcyjne jest źródłem ciągłej „inokulacji" szczepów podczas fermentacji i dojrzewania, które mogą mieć istotne cechy technologiczne i wpływać na cechy produktu końcowego [30]. Techniki oparte na 16S rDNA i ITS wykazały, że *Pseudomonas*, *Acinetobacter, Debaryomyces* i *Lactococcus* zdominowały powierzchnie linii technologicznych zakładów mleczarskich [83], a bakterie i drożdże stanowiące mikrobiotę zakwasów chlebowych były obecne na powierzchniach produkcyjnych w piekarniach [92].

Należy pamiętać, że jakość końcowego produktu spożywczego zależy nie tylko od higieny środowiska przetwarzania, ale także od jakości użytych surowców. Na przykład, podejście oparte o 16S rDNA wykazało, że mleko o większej liczbie komórek somatycznych było związane z wyższą liczebnością niektórych taksonów bakteryjnych, w tym *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* oraz *Thermoanaerobacterium*, rodzajem zidentyfikowanym po raz pierwszy w metagenomie próbki mleka [76]. Obecność organizmów psujących (*Acinetobacter*, *Thermoanaerobacterium*) jak również bakterii chorobotwórczych (*Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*) w surowcu, może zanieczyszczać rezydentny mikrobiom zbiorczego mleka oraz stanowić zagrożenie dla całej linii produkcyjnej. Wpływ ekologii środowisk przetwórczych na jakość żywności wykazano w bardziej rozbudowanych badaniach z udziałem cystern mlecznych [38]. Analiza 16S rDNA wykazała, że na mikrobiom mleka w silosach wpływa mikrobiom masowych cystern oraz, że różne zbiorowiska bakteryjne ewoluowały w obrębie różnych silosów mlecznych. Ponadto badania wykazały, że skład taksonomiczny mikrobiomu mleka zmieniał się sezonowo, ponieważ większa różnorodność genetyczna bakterii była związana z sezonem wiosennym [72].

Podobne obserwacje dotyczą zakładów przetwórstwa mięsnego. Środowisko produkcji ma istotny wpływ na ekologię mikrobiologiczną tusz zwierzęcych. Tusze zwierzęce charakteryzowały się dużą różnorodnością mikrobiologiczną, w wśród której stwierdzenio dobrze znane rodzaje bakterii skorelowane z psuciem mięsa. Badania z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania (HTS) zostały użyte do śledzenia źródeł zanieczyszczeń świeżego mięsa, gotowanych kiełbas, filetów z łososia a także gotowej do spożycia żywności [15]. Większość gatunków bakterii zidentyfikowanych w wymazach środowiskowych z rzeźni, wykryto również w befsztykach wołowych, np.: *S. equorum*, *Propionibacterium acnes*, *Psychromonas arctica*, czy *Psychrobacter* sp. [39]. Obecność mikroorganizmów powodujących psucie w bezpośrednim otoczeniu linii technologicznej istotnie obniża okres przydatności matrycy spożywczej już na początku jej produkcji.

Przemysł spożywczy w coraz większym stopniu będzie wykorzystywał technologię NGS do szerokiej gamy analiz związanych z kontrolą jakości żywności, w tym oceny autentyczności, pochodzenia, składu oraz bezpieczeństwa na wszystkich etapach produkcji żywności. Przede wszystkim jest to podyktowane koniecznością monitorowania procedur fermentacyjnych

i kontroli żywności wzbogacanej kulturami bakterii probiotycznych oraz suplementami diety. Zastosowanie zintegrowanej technologii „food-omics" będzie miało istotne znaczenie w celu zwiększenia bezpieczeństwa dostępnej na rynku spożywczym fermentowanej żywności, poprzez ocenę przetrwania patogenów, toksynogenów lub identyfikację gatunków odpowiedzialnych za psucie się fermentowanych produktów. Na przykład, analizy 16S rDNA i metabolomu zostały wykorzystane do identyfikacji mikroorganizmów odpowiedzialnych za syntezę amin biogennych w chińskim winie ryżowym. Stwierdzono silną korelacje między poziomem produkowanych amin biogennych a względną liczebnością kilku taksonów bakteryjnych, tj. Staphylococcus, Leuconostoc, *Weissella* i Lactococcus [50]. W innych badaniu zagrożenie związane z wykryciem *P. mirabilis* i *Staphylococcus* spp. zostało wskazane w analizie 16S rDNA zastosowanej do izolatów fermentowanej żywności sojowej oraz fermentowanych próbek wieprzowiny [79]. Poważnym wyzwaniem dla sektora spożywczego jest również zapewnienie bezpieczeństwa żywności minimalnie przetworzonej, żywności gotowej do spożycia (tzw. łatwej), importowanej i etnicznej [88].

Uwierzytelnienie żywności poprzez ocenę składu produktów spożywczych jest ważne dla ograniczenia zanieczyszczeń krzyżowych, fałszerstw żywnościowych oraz ochrony jakości żywności na każdym etapie łańcucha dostaw. Technologie „food-omics" mogą znaleźć zastosowanie w uwierzytelnianiu roślinnych produktów żywnościowych, autentyczności produktów, wykrywania śladowych ilości DNA gatunków obcych oraz w identyfikacji często błędnie oznakowanych gatunków ryb i suplementów ziołowych [52]. Wraz ze wzrostem światowego handlu produktami żywnościowymi i suplementami diety, dokładne i szybkie uwierzytelnienie jest niezbędne do prawidłowego etykietowania produktów w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności. Analizy proteomiczne umożliwiły szybkie i bezpośrednie porównanie i klasyfikację 33 chorwackich białych win [74]. Profilowanie metaproteomu win wykazało obecność 20 białek. Co ciekawe, tylko pięć z nich było bezpośrednio skorelowanych z odpowiednią odmianą winogron, pozostałe profile białkowe zostały przypisane do rdzennie zróżnicowanej mikrobioty bakterii i grzybów. Natomiast profilowanie metabolomu zostało wykorzystana do autoryzacji drożdży piwowarskich [94], włoskiego sera mozzarella bawolego lub krowiego [67], a także do określenia pochodzenia geograficznego Kimchi [40].

Nie mniej jednak, analizy metagenomiczne w oparciu o WGS nie mogą być obecnie stosowane do identyfikacji i kwantyfikacji patogenów w celach regulacyjnych z powodu ograniczeń dostępnej technologii i niekompletności baz danych genomów bakteryjnych. Maksymalne korzyści z wykorzystania WGS patogenów zostaną osiągnięte jeśli zsekwencjonowane genomy zostaną zdeponowane w publicznych bazach danych. Aby rozwinąć to podejście, w ramach Konsorcjum Sekwencjonowania Łańcucha Dostaw Żywności (CSFSC) została opracowana spójna baza danych sekwencji genomowych i metagenomowych społeczności mikroorganizmów oraz niestandardowe symulowane zestawy danych sekwencji żywności *in silico* [52, 75]. Surowe dane sekwencjonowania można również przesłać do międzynarodowego zasobu archiwum publicznego „Sequence Read Archive (SRA) lub za pośrednictwem Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI, https://www.ncbi.nlm.gov/sra), Europejskiego Instytutu Bioinformatyki (EBI, https://www.ebi.ac.uk/ena) oraz DNA Data Bank of Japan (DDBJ, https://www.ddbj.nig.ac.jp) [90]. W połączeniu z szeroką gamą narzędzi bioinformatycznych możliwe będzie opracowanie czułych i szybkich protokołów do analizy autentyczności żywności i kwantyfikacji przetworzonych produktów spożywczych.

4. Podsumowanie

Podobnie jak w innych dziedzinach nauki, techniki oparte na sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) ostatecznie zrewolucjonizują mikrobiologię żywności. Profilowanie metagenomów, wykrywanie patogenów, eksploracja danych genetycznych, łączenie genotypów i fenotypów, określenie losów starterów i patogenów w produkcji i dojrzewaniu żywności oraz przewidywanie okresu przydatności produktów będą domeną tych wysokowydajnych technologii. Analizy te muszą być jednak połączone z integrowanymi metodami „omics", które łączą metagenomikę z metatranskryptomiką i metaproteomikę z metabolomiką. W przyszłości technologie „food-omics" będą wdrożone do śledzenia surowców i produktów spożywczych na różnych etapach łańcucha produkcyjnego i w różnych obszarach zakładów produkcyjnych, gdzie konieczne jest podjęcie działań zmierzających do poprawy stosowanych praktyk higienicznych, optymalizacji procesów produkcyjnych, opracowania i ulepszania strategii zarządzania bezpieczeństwem i jakością żywności. Sektor przemysłu spożywczego już w tej chwili musi sprostać wyzwaniom stawianym przez konsumentów, którzy coraz częściej oczekują zapewniania dostępu do rzetelnych informacji na temat jakości i bezpieczeństwa oferowanego produktu. Jednak, cały proces monitorowania łańcucha żywnościowego musi być szybki i niedrogi, aby technologie oparte na NGS mogły być powszechnie stosowane.

Podsumowując, metagenomika w połączeniu z technologiami „food-omics" umożliwi precyzyjne zaprojektowanie skutecznych strategii analiz i konserwacji żywności w celu osiągnięcia równowagi pomiędzy zapewnieniem bezpieczeństwa produktów a utrzymaniem wysokich standardów ich jakości.

Podziękowania

Artykuł powstał w ramach projektu o numerze 1/ZM-136-01/20 oraz SPUB-16/E-171/SPUB/SN/2019 finansowanego przez Ministerstwo Nauki Szkolnictwa Wyższego.

Piśmiennictwo

1. Alegria A., Szczesny P., Mayo B., Bardowski J., Kowalczyk M.: Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and independent approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1890–1898 (2012)
2. Bokulich N.A., Collins T.S., Masarweh C., Allen G., Heymann H., Ebeler S.E.: Associations among wine grape microbiome, metabolome and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio*, **7**, e00631–16 (2016)
3. Bokulich N.A., Thorngate J.H., Richardson P.M., Mills D.A.: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **111**, E139–48 (2014)
4. Boreczek J., Litwinek D., Żylińska-Urban J., Izak D., Buksa K., Gawor J., Gromadka R., Bardowski J.K., Kowalczyk M.: Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, splet and rye wholemeal flour. *Microbiology Open*, **9**, e1009 (2020)
5. Bridier A.: Exploring foodborne pathogen ecology and antimicrobial resistance in the light of shotgun metagenomics. *Methods Mol. Biol.* **1918**, 229–245 (2019)
6. Cao Y., Fanning S., Proos S., Jordan K., Srikumar S.: A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front. Microbiol.* **8**, 1829 (2017)
7. Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., et al.: Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol.* **220**, 63–72 (2016)
8. Cifuentesa A.: Food analysis and foodomics. *J. Chromatogr A*., 1216, 7109 (2009)
9. Cocolin L., Alessandria V., Botta C., Gorra R., De Filippis., Ercolini D., Rantsiou K.: NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *Plos One*, **8**, e69074 (2013)
10. Cook P., Nightingale K.K.: Use of omics methods for the advancement of food quality and food safety. *Anim. Front*. **8**, 31–41 (2018)
11. Coton M., Pawtowski A., Taminiau B., Burgaud G., Deniel F., Coulloumme-Labarthe L.: Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**, fix048 (2017)
12. De Filippis F., Genovese A., Ferranti P., Gilbert J.A., Ercolini D.: Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate". *Sci. Rep.* **6**, 21871 (2016)
13. De Filippis F., La Storia A., Villani F., Ercolini D.: Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *Plos One,* 8, e70222 (2013)
14. De Filippis F., Parente E., Ercolini D.: Metagenomics insights into food fermentations. *Microb. Biotechnol*. 10, 91–102 (2017)
15. De Filippis F., Parente E., Ercolini D.: Recent past, present, and future of the food microbiome. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**, 589–608 (2018)
16. De Pasquale I., Di Cagno R., Buchin S., De Angelis M., Gobbetti M.: Spatial distribution of the metabolically active microbiota within Italian PDO ewes' milk cheeses. *Plos One*, **11**, e0153213 (2016)
17. De Vuyst L., Harth H., Van Kerrebroeck S., Leroy F.: Microbiol ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Food Microbiol*. **37**, 11–29 (2017)
18. De Vuyst L., Harth H., Van Kerrebroeck S., Leroy F.: Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *Int. J. Food Microbiol*. **239**, 26–34 (2016)
19. Du F., Zhang X., Gu H., Song J., Gao X.: Dynamic changes in the bacterial community during the fermentation of traditional Chinese fish Sauce (TCFS) and their correlation with TCFS quality. *Microorganisms*, **19**, 371 (2019)
20. Ercolini D.: High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3148–3155 (2013)
21. Escobar-Zepeda A., Sanches-Flores A., Quirasco Boruch M.: Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol.* **57**, 116–27 (2016)
22. Fagerquist C.K., Zaragoza W.J., Sułtan O., Woo N., Quinones B., Cooley M.B., Mandrell R.E.: Top-down proteomic identification of Shiga toxin 2 subtypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-tandem time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol*. **80**, 2928–2940 (2014)
23. Fei Y., Li L., Chen L., Zheng Y., Yu B.: High-throughput sequencing and culture-based approaches to analyze microbial diversity associated with chemical changes in naturally fermented tofu whey, a traditional Chinese tofu-coagulant. *Food Microbiol.* **76**, 69–77 (2018)
24. Ferrocino I., Greppi A., La Storia A., Rantsiou K., Ercolini D., Cocolin L.: Impact of nisin-activated packaging on microbiota of beef burgers during storage. *Appl. Environ. Microbiol*. **82**, 549–559 (2016)
25. Ferrocino L., Bellio A., Giordano M., Macori G., Romano A., Rantsiou K., Decastelli L., Cocolin L.: Shotgun metagenomics and volatilome profile of the microbiota of fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol*., **84**, e02120–17 (2018)
26. Forbes J.D., Knox N., Ronholm J., Pagotto F., Relmer A.: Metagenomics: The next culture-independent game changer. *Front. Microbiol*. **8**, 1069 (2017)
27. Fougy L., Desmonts M.H., Coeuret G., Fassel Ch., Hamon E., Hezard B., Champonier-Verges M.Ch., Chaillou S.: Reducing Salt in Raw Pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol*. **82**, 3928–3939 (2016)
28. Gilquin B., Jaquinod M., Louwagie M., Kieffer-Jaquinod S., Kraut A., Ferro M., Becher F., Brun V.: A proteomics assay to detect eight CBRN-relevant toxins in food, *Proteomics*, **17**, 1–2 (2017)
29. Gobbetti M., Minervini F., Pontonio E., Di Cango R., De Angelis M.: Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *J. Food Microbiol.* **239**, 3–18 (2016)
30. Greppi A., Ferrrocino I., La Storia A., Rantsiou K., Ercolini D., Cocolin L.: Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *Int. J. Food Microbiol*. **212**, 67–75 (2015)
31. Hong X., Chen J., Liu L., Wu H., Tan H., Xie G., Xu Q., Zou H., Yu W., Wang L., Qin N.: Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese rice wine. *Sci. Rep*. **6**, 26621 (2016)
32. Huang Z.R., Honga J.L., Xua J.X., Lia L., Guoa W.L., Yang Y., Chenc S.J.: Exploring core functional microbiota responsible for the production of volatile flavour during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine. *Food Microbiol.* **76**, 487–496 (2018)

33. Illeghems K., Weckx S., De Vuyst L.: Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. *Food Microbiol.* **50**, 54–63 (2015)
34. Jadhav S., Sevior D., Bhave M., Palombo E.A.: Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Proteomics*. **97**, 100–106 (2014)
35. Jagadeesan B., Gerner-Smidt P., Allard M.W., Leuillet S., Winkler A., Xiao Y., Chaffron S.: The use of next generation sequencing for improving food safety: translation into practice. *Food Microbiol.* **79**, 96–115 (2019)
36. Jung J., Choi S., Jeon C.O., Park W.: Pyrosequencing-based analysis of the bacterial community in Korean traditional seafood, ojingeo jeotgal. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1428–1433 (2013)
37. Jung W.Y., Jung J.Y., Lee H.J.: Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of Doenjang: a traditional Korean fermented soybean paste. *Front. Microbiol.* **7**, 827 (2016)
38. Kable M.E., Srisengfa Y., laird M., Zaragoza J., Mcleod J., Heidenreich J.: The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, **7**, 1–13 (2016)
39. Kergourlay G., Taminiau B., Daube G., Vergès M.Ch.: Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *In. J. Food Microbiol.* **231**, 31–39 (2015)
40. Kim J., Jung Y., Bong Y.S., Lee K.S., Hwang G.S.: Determination of the geographical origin of Kimchi by (1) H NRM based metabolite profiling. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1752–1757 (2012)
41. Kim Y.S., Kim M.C., Kwon S.W., Kim S.J., Park I.C., Ka J.O., Weon H.Y.: Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation--based and pyrosequencing methods. *J. Microbiol*. **49**, 340–348 (2011)
42. Kumar J., Sharma N., Kaushal G., Samurailatpam S., Sahoo D., Rai A.K., Singh S.P.: Metagenomic insights into the taxonomic and functional features of *Kinema*, a traditional fermented soybean product of Sikkim Himalaya. *Front. Microbiol.* **10**, 1744 (2019)
43. Lee S.H., Jung J.Y., Jeon C.O.: Effects of temperature on microbial succession and metabolite change during saeu-jeot fermentation. *Food Microbiol.* **38**, 16–25 (2014)
44. Leff J.W., Fieser N.: Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *Plos One*, **8**, e59310 (2013)
45. Leonard S.R., Mammel M.K., Lacher D.W., Elkins Ch.A.: Application of metagenomic sequencing to food safety: detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli on fresh bagged spinach. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 8183-8191 (2015)
46. Lessard M.H., Viel C., Boyle B., St-Gelais D., Labrie S.: Metatranscriptome analysis of fungal straits *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*, **15**, 235 (2014)
47. Li Z., Feng C., Luo X., Yao H., Zhang D., Zhang T.: Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis. *Food Microbiol.* **76**, 405–415 (2018)
48. Liu D., Zhang P., Chen D., Howell K.: From the vineyard to the winery: how microbial Ecology drives regional distinctiveness of wine. *Front. Microbiol.* **10**, 2679 (2019)
49. Liu S., Chena Q., Zoub H., Yud Y., Zhou Z., Maoa J., Zhange S.: A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized huangjiu fermentation mashes. *Int. J. Food Microbiol.* **303**, 9–18 (2019)
50. Liu S.P., Yu J.X., Wei X.L., Ji Z.W., Zhou Z.L.: Sequencing-based screening of functional microorganism to decrease the formation of biogenic amines in Chinese rice wine. *Food Control*. **64**, 98–104 (2016)
51. Liu T., Li Y., Yang Y., Yi H., Znang L.: The influence of different lactic acid bacteria on sourdough flavor and a deep insight into sourdough fermentation through RNA sequencing. *Food Chem*. **307**, 125529 (2020)
52. Lo Y.T, Shaw P.Ch.: DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem*. **240**, 767–774 (2017)
53. Looft T., Jahnson T.A., Allen H.K., Bayles D.O., Alt D.P., Stedtfeld R.D.: Infeed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1691–1696 (2012)
54. Lopez-Velasco G., Welbaum G.E., Boyer R.R., Mane S.P., Ponder M.A.: Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1203–1214 (2011)
55. Marino M., Innocente N., Maifreni M., Mounier J., Cobo-Diaz J.F., coton E.: Diversity within Italian chesse making brine-associated bacterial communities evidenced by massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *Front Microbiol.* **8**, 2119 (2017)
56. Marsh A., O'Sullivan O., Hill C., Cotter P.D.: Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol*. **38**, 171–178 (2014)
57. Maury M., Tsai Y.H., Chalier C., Touchon M., Chenal-Francisque V.: Uncovering *Listeria Monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet*. **48**, 308–313 (2016)
58. Minervini F., Celano G., Lattanzi A., De Angelis M., Gobbetti M.: Added ingredients affect the microbiota and biochemical characteristics of durum wheat type-I sourdough. *Food Microbiol*. **60**, 112–123 (2016)
59. Monnet C., Dugat-Bony E., Swennen D., Beckerich J.M., Irlinger F.: Investigation of the activity of the microorganisms in a Reblochon-style cheese by metatranscriptomic analysis. *Front. Microbiol*. **7**, 536 (2016)
60. Morgan H.H., du Toit M., Setati M.E. The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing. *Front Microbiol*. **11**, 8–820 (2017)
61. Nam Y.D., Lee S.Y., Lim S.I.: Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol*. 155, 36–42 (2012)
62. Nam Y.D., Park S.I., Lim S.I.: Microbial composition of the Korean traditional food "kochujang" analyzed by a massive sequencing technique. *J. Food Sci*. **77**, 250–256 (2012)
63. Nam Y.D., Yi S-H., Lim S.I.: Bacterial diversity of Cheonggukjang a traditional Korean fermented food analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control*, **28**, 135–142 (2012)
64. Noyes N.R., Yang X., Linke L.M., Magnuson R.J., Dettenwanger A., Cook S., Geornaras I.: Resistome diversity in cattle and the environment decreases during beef production. *ELife*, **5**, e13195 (2016)
65. Ottesen A., Ramachandran P., Reed E., White J.R., Hasan N., Subramanian P., et al.: Enrichment dynamics of *Listeria monocytogenes* and the associated microbiome from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *BMC Microbiol.* **16**, 275 (2016)
66. Pinto C., Pinho D., Sousa S., Pinheiro M., Egas C., Gomes A.C.: Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One*, **9**, e85622 (2014)

67. Pisano M.B., Scano P., Murgia A., Cosentino S., Caboni P.: Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chem*. **192**, 618–624 (2016)
68. Pitta D.W., Dou Z., Kumar S., Indugu N., Toth J.D., Vecchiarelli B.: Metagenomic evidence of the prevalence and distribution patterns of antimicrobial resistance genes in dairy agroecosystems. *Foodborne Pathog. Dis*. **13**, 296–302 (2016)
69. Połka J., Rebecchi A., Pisacane V., Morelli L., Puglisi E.: Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiol*. **46**, 342–356 (2015)
70. Portillo M.D.C., Franquès J., Araque I., Reguant C., Bordons A.: Bacterial diversity of grenache and carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol*. **219**, 56–63 (2016)
71. Quigley L., O'Dullivan D.J., Daly D., O'Sullivan O., Burdikova Z., Vana R., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., McSweeney P.L.: Thermus and the pink discoloration defect in cheese. *mSystems*, **1**, e00023–16 (2016)
72. Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F.: The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev*. **37**, 664–698 (2013)
73. Rantsiou K., Cocolin L.: New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausage as determined by molecular methods: a review. *Int. J. Food Microbiol*. **108**, 255–267 (2006)
74. Rešetar D., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Katalinić J.P., Pavelić S.K.: Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry linear time-of-flight method for white wine fingerprinting and classification. *Food Control*, **64**, 157–164 (2016)
75. Rhoads A., Au K.F.: PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13**, 278–289 (2015)
76. Rodrigues M.X., Lima S.F., Canniatti-Brazaca S.G., Bicalho R.C.: The microbiome of bulk tank milk: characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *J. Dairy Sci*. **100**, 2536–2552 (2017)
77. Setati M.E., Jacobson D., Andong U.C., Bauer F.F.: The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One*, **7**, e52609 (2012)
78. Shen Y., Nie J., Kuang L., Zhang J., Li H.: DNA Sequencing, genomes and genetic markers of microbes on fruits and vegetables. *Microb. Biotechnol*. **0**, 1–40 (2020)
79. Shing P., Karimi A., Devendra K., Waldroup P.W., Cho K.K., Kwon Y.M.: Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. *Poult. Sci*. **92**, 272–276 (2013)
80. Singh T.A., Devi K.R., Ahmed G., Jeyaram K.: Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. *Food Res. Intern*. **55**, 356–362 (2014)
81. Smid E., Lacroix C.: Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol*. **25**, 148–154 (2013)
82. Stefanini I., Cavalieri D.: Metagenomic approaches to investigate the contribution of the vineyard environment to the quality of wine fermentation: potentials and difficulties. *Front. Microbiol*. **9**, 991 (2018)
83. Stellato G., De Filippis F., La Storia A., Ercolini D.: Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiol*. **81**, 7893–7904 (2015)
84. Sulaiman J., Gan H.M., Yin W.F., Chan K.G.: Microbiol succession and the functional potential during the fermentation of Chinese soy sauce brine. *Front. Microbiol*. **5**, 556 (2014)
85. Tan G., Hu M., Pan Z., Li M., Li L., Yang M.: High-throughput sequencing and metabolomics reveal differences in bacterial diversity and metabolites between red and white Sufu. *Front. Microbiol*. **11**, 758 (2020)
86. Taylor M.W., Tsai P., Anfang N., Ross H.A., Goddard M.R.: Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ. Microbiol*. **16**, 2848–2858 (2014)
87. Van Kerrebrock S., Maes D., De Vuyst L.: Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol*. **68**, 152–159 (2017)
88. Walsh A.M., Crispie F., Daari K., O'Sullivan O., Martin J.C., Arthur C.T., Claesson M.J., Scott K.P., Cotter P.D.: Strain-level metagenomic analysis of the fermented dairy beverage nunu highlights potential food safety risks. *Appl. Environ. Microbiol*. **83**, e01144–17 (2017)
89. Wolfe B.E., Button J.E., Santarelli M., Dutton R.: Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, **158**, 422–433 (2014)
90. Xu Y.J.: Foodomics: a novel approach for food microbiology. *TrAC*., **96**, 14–21 (2017)
91. Yang Y., Noyes N.R., Doster E., Martin J.N.: Use of metagenomic shotgun sequencing technology to detect foodborne pathogens within the microbiome of the beef production chain. *Appl. Environ. Microbiol*. **82**, 2433–2443 (2016)
92. Zarraonaindia I., Owens S.M., Weisenhorn P., West K., Hampton-Marcell J., Lax S., Bokulich N.A..: The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio.* **6,** e02527–14 (2015)
93. Zhang G., Zhang W., Sadiq F.A., Arbab S.K., Guoqing He G.: Microbiota succession and metabolite changes during the traditional sourdough fermentation of Chinese steamed bread. *CyTA – Journal of Food*, **17**, 172–179 (2019)
94. Zhang J., Plowmar J.E., Tiam B., Clerens S., On S.L.W.: An improved method for MALDI-TOF analysis of wine-associated yeasts. *J. Microbiol. Meth*. **172**, 105904 (2020)
95. Zhao M., Su X.Q, Nian B., Chen L.J., Zhang D.L., Duan S.M., Ma Y.: Integrated meta-omics approaches to understand the microbiome of spontaneous fermentation of traditional Chinese Pu-erh tea. *Msysystems*, **4**, e00680 (2019)
96. Zheng X., Liu F., Shi X., Wang B., Li K., Li B.: Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. *Food Res. Intern*. **105**, 733–742 (2018)
97. Zhou B., Ma C., Ren X.Y., Xia T., Zheng Ch., Liu X.: Correlation analysis between filamentous fungi and chemical compositions in a Pu-erh type tea after a long-term storage. *Food. Sci. Nutr*. **8**, 2501–2511 (2020)
98. Zhou B. , Ma C., Ren X., Xia T., Li X., Wu Y.: Production of theophylline via aerobic fermentation of Pu-erh tea using tea-derived fungi. *BMC Microbiol*. **19**, 261 (2019)
99. Zhu M., , Li N., Zhou F., Ouyang J., Lu D., Xu W., Li J., Lin H., Zhang Z., Xiao J., Wang K., Huang J., Liu Z., Wu J.: Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea. *Food Chem*. **312**, 126043 (2020)
100. Zhu Y.C., Luo Y.H., Wang P.P., Zhao MY., Li L., Hu XS., Chen F.: Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation. *Food. Chem*. **194**, 643–649 (2016)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 77–89
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.07

PIASKOWNICE JAKO POTENCJALNE ŹRÓDŁO ZAGROŻENIA LEKOOPORNYMI SZCZEPAMI *ESCHERICHIA COLI* ORAZ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Edyta Mazur[1]*, Maria Jolanta Chmiel[2]

[1] Grupa Ewolucji i Interakcji Organizmalnych, Instytut Botaniki im. W. Szafera Polskiej Akademii Nauk
[2] Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2020 r.

Streszczenie: Piaskownice obecne są prawie na każdym placu zabaw. Cieszą się niesłabnącą popularnością wśród najmłodszych. Zastanawiamy się czasem kto odpowiada za ich stan sanitarny albo czy zabawa w nich może być zagrożeniem dla dzieci? W niniejszym artykule poruszony zostanie temat monitorowania stanu sanitarnego piaskownic. Przedstawione zostanie również zagrożenie mikrobiologiczne jakie niesie za sobą kontakt ze skażonym piaskiem. Bateriami, które stanowią zagrożenie dla zdrowia i mogą zasiedlać piaskownice są m.in. *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus*. Oba te mikroorganizmy nie powinny występować w środowisku naturalnym. Ich obecność świadczy o skażeniu piasku, a kontakt z nim może być niebezpieczny dla zdrowia człowieka. Co więcej bakterie te coraz częściej wykazują oporność na antybiotyki stosowane rutynowo w leczeniu zakażeń. Problem oporności mikroorganizmów na terapeutyki jest bardzo istotny, gdyż liczba lekoopornych szczepów rośnie alarmująco. Pula skutecznych antybiotyków maleje, a nowych nie przybywa. W niniejszej pracy zostaną przedstawione antybiotyki, wykorzystywane podczas leczenia, są to aminoglikozydy, ansamycyny, antybiotyki β-laktamowe, chinolony, fusydany, grupa MLS, sulfonoamidy oraz tetracykliny. W pracy przedstawiono również informacje dotyczące poznanych dotychczas mechanizmów działania antybiotyków: W artykule przestawiono również mechanizmy oporności pałeczek *Enterobacteriaceae*; mechanizm ESBL (extended-spectrum β-lactamases), produkcja MBL (metallo-β-lactamase), CRE (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) oraz mechanizmy oporności *Staphylococcus aureus* na penicylinę, MRSA – methicillin-resistant *S. aureus* i wankomycynę VRSA – vancomycin-resistant *S. aureus*. Lekooporności stała się problemem o znaczeniu globalnym. Obecność szczepów lekoopornych niesie za sobą ryzyko rozprzestrzeniania się opornych na działanie antybiotyków szczepów mikroorganizmów w środowiskach naturalnych m.in. wodzie, powietrzu, glebie a także w piasku. Zakażenia powodowane przez takie drobnoustroje są bardzo trudne w leczeniu, gdyż maleje pula antybiotyków możliwych do zastosowania w czasie kuracji, a tym samym zmniejsza się skuteczność terapii.

1. Wstęp. 2. Monitorowanie stanu sanitarnego piaskownic. 3. Bakterie *E. coli* i *S. aureus* jako potencjalny czynnik zagrożenia dla zdrowia. 4. Charakterystyka antybiotyków. 4.1. Grupy antybiotyków. 4.2. Mechanizm działania antybiotyków. 5. Oporność bakterii na antybiotyki. 5.1. Oporność pałeczek *Enterobacteriaceae*. 5.2. Oporność *S. aureus*. 6. Oporność jako problem o znaczeniu globalnym. 7. Podsumowanie. 8. Bibliografia

SANDBOXES AS A POTENTIAL SOURCE OF DENGEROUS DRUG-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS

Abstract: Sandboxes are present on almost every playground. They enjoy constant popularity among the youngest. Are we sometimes wonder who is responsible for their sanitary condition? Play in them can be a threat to children? This article will discuss the subject of monitoring the sanitary condition of sandboxes. The microbiological threat of contact with contaminated sand will also be presented. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are bacteria that can inhabit sandboxes and pose a threat to health. Both of these microorganisms should not be found in the environment. Their presence means contamination of sand, and contact with it can be hazardous to human health. What's more, these bacteria increasingly show resistance to antibiotics routinely used to treat infections. The problem of microorganism resistance to therapeutics is very important because the number of drug-resistant strains is growing alarmingly. The pool of effective antibiotics is contracting and new ones are not developing. In this work, antibiotics used during the treatment will be presented: aminoglycosides, ansamycins, β-lactam antibiotics, quinolones, fusidans, MLS group, sulfonamides, and tetracyclines. The paper also presents information concerning so far known mechanisms of antibiotic action. The article also presents the resistance mechanisms of *Enterobacteriaceae*; ESBL mechanism (extended-spectrum β-lactamases), production of MBL (metallo-β-lactamase), CRE (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) and resistance mechanisms of *S. aureus*, to penicillin, MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*, and for vancomycin VRSA resistant *S. aureus*. Drug resistance has become a global problem. The presence of drug-resistant strains carries the risk of spreading antibiotic-resistant strains of microorganisms in natural environments like water, air, soil and sand. Infections caused by such microorganisms are very difficult to treat, because the small pool of antibiotics that can be used during treatment, and thus reduces the effectiveness of therapy.

1. Introduction. 2. Monitoring of the sandboxes sanitary condition. 3. 3. Bacteria *E. coli* and *S. aureus* as a potential health hazard factor. 4. Antibiotics characteristic. 4.1. Antibiotics grups. 4.2. Mechanism of antibiotics action. 5. Antibiotic resistance. 5.1. Resistance of *Enterobacteriaceae*. 5.2. Resistance of *S. aureus* 6. Resistance as a global problem. 7. Conclusions. 8. Bibilography

Słowa kluczowe: *Escherichia coli,* lekooporność, piaskownice, *Staphylococcus aureus*
Keywords: *Escherichia coli,* drug-resistance, sandboxes, *Staphylococcus aureus*

* Autor korespondencyjny: mgr inż. Edyta Mazur, Zakład Lichenologii, Instytut Botaniki im. W. Szafera Polskiej Akademii Nauk, Lubicz 46, 31-512 Kraków; 880958096; e-mail: e.mazur@botany.pl

1. Wstęp

Piaskownice są stałym elementem większości placów zabaw, chętnie wykorzystywanym przez bawiące się dzieci. Spotykane są bardzo często na osiedlowych placach zabaw oraz w parkach, gromadząc wokół dużą ilość chętnie bawiących się dzieci. Warto jednak zadać pytanie, czy piaskownice są bezpieczne? W powszechnej świadomości rodziców i opiekunów piaskownice są dla dzieci bezpieczne, a ewentualne obawy budzi czasem możliwość zanieczyszczenia piasku odchodami zwierząt i przenoszonymi w nich pasożytami. Panujące w piaskownicach warunki: podwyższona wilgotność oraz temperatura pomiędzy 22–30°C, sprzyjają wzrostowi bakterii i grzybów w tym dermatofitów. Wśród tych mikroorganizmów mogą być patogeny wywołujące grzybice, które nie tylko zmieniają powierzchnię skóry wywołując dyskomfort ale również są trudne w leczeniu. Coraz częściej w miejscach użyteczności publicznej pojawiają się mikroorganizmy, których obecność wydaje się być niepokojąca. Przykładem są bakterie *Escherichia coli*, których naturalnym miejscem bytowania jest jelito grube ludzi i zwierząt oraz *Staphylococcus aureus* zasiedlający najczęściej gardło oraz jamę nosową. Pojawienie się tych mikroorganizmów oznacza, iż kontakt ze skażonym piaskiem stanowi zagrożenie dla zdrowia. Pałeczka okrężnicy może być przyczyną dolegliwości żołądkowych, biegunek, wymiotów, złego samopoczucia, jak również ogólnego osłabienia organizmu, zakażenie następuje najczęściej drogą pokarmową. Szacunki na rok 2010 przedstawiły, iż na całym świecie wystąpiło 320 mln infekcji bakterią *E. coli*, a aż 200 000 zakończyło się śmiercią pacjentów [39]. Natomiast *S. aureus* wywołuje różnego rodzaju infekcje skórne, infekcje dróg oddechowych oraz zapalenia, a sam proces zakażenia może przebiegać przez kontakt zranionej skóry z zakażoną powierzchnią. Niestety leczenie jest bardzo utrudnione z racji tego, iż duża liczba szczepów jest zdolna do produkcji penicylinazy, przez co zastosowanie penicyliny w leczeniu jest nieskuteczne. Zjawisko to zostało zaobserwowane już w 1944 roku [40]. Co więcej obie badane bakterie są zdolne do produkcji niebezpiecznych dla zdrowia enterotoksyn. Kolejnym istotnym problemem jest lekooporność drobnoustrojów. Wzrasta udział szczepów opornych na działanie antybiotyków, z których znaczną część cechuje wielolekooporność. Oznacza to, iż maleje pula skutecznych antybiotyków, co utrudnia leczenie i powrót do zdrowia. Niestety antybiotykooporność wśród szczepów *S. aureus* jest przyczyną chorób, a niekiedy śmierci na szpitalnych oddziałach intensywnej terapii [40]. W celu zapobiegania szerzącej się lekooporności państwa członkowskie Unii Europejskiej 18 listopada obchodzą Dzień Wiedzy o Antybiotykach (European Awareness Day). Przedsięwzięcie to ma na celu rozpowszechnienie wiedzy o narastającym problemie oraz uświadamianie społeczeństwa, iż nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków stanowi poważny problem. Czas poświęcony na odkrycie, syntezę oraz wprowadzenie nowego antybiotyku jest znacznie dłuższy niż nabycie przez mikroorganizmy lekooporności. Ostatni odkryty po 15 latach antybiotyk – tejksobaktyna został opisany w 2014 przez Ling i in. [45]. Naukowcy coraz częściej starają się odkryć nowe antybiotyki, ponieważ wzrastająca liczba wielolekoopornych szczepów utrudnia, czasami wręcz uniemożliwia leczenie. W 2013 roku została odkryta, a w 2018 dokładnie opisana nowa grupa antybiotyków odilorhabdiny, która w badaniach na myszach wykazuje działanie przeciw drobnoustrojom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym [65]. Niestety problem lekooporności jest bardzo poważny, dlatego tak istotne jest monitorowanie środowiska pod kątem występowania opornych szczepów *E. coli* oraz *S. aureus*.

2. Monitorowanie stanu sanitarnego piaskownic

Istnieją dwa akty prawne, które pomagają gminom zachować odpowiedni standard higieniczny piaskownic. W artykule 22 ustawy 1 z 5 grudnia 2008 r. mówiącym o zapobieganiu zakażeniom oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi, wskazane jest, iż właściciel, posiadacz lub zarządzający mieniem jest zobowiązany utrzymać je w odpowiednim stanie higieniczno-sanitarnym, aby zapobiegać szerzącym się zakażeniom i chorobom zakaźnym. W tym celu winien zadbać o prawidłową gospodarkę odpadów, usuwać odchody zwierząt z nieruchomości jak również martwe zwierzęta, a także zwalczać pojawiające się gryzonie i insekty (Dz.U. Nr 234, poz. 1570). Również mając na względzie ochronę zdrowia publicznego w Obwieszczeniu Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 28 listopada 2005 roku w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o utrzymaniu czystości i porządku w gminach (Dz.U. z 2005 r. Nr 236, poz. 2008 z późniejszymi zmianami) został ujęty zapis mówiący o usuwaniu zanieczyszczeń z części nieruchomości służącej do użytku publicznego. Jednocześnie właściciel powinien zapewnić zabezpieczenia przed dostępem zwierząt np. w postaci ogrodzeń, bramek lub siatek, w celu zapobiegnięcia pojawienia się odchodów. Niestety Ministerstwo Zdrowia nie opracowało żadnego rozporządzenia, w którym znajdują się normy lub wartości referencyjne dotyczące dopuszczalnego zanieczyszczenia mikrobiologicznego piasku przez grzyby czy bakterie – w tym wskaźnikowe *E. coli* oraz *S. aureus*, których przekroczenie zakazywałoby korzystania z piaskownicy. Według zalecenia Głównego Inspektora Sanitarnego z dnia 05.05.2009 r. (89) piasek powinien zostać

wymieniony przed sezonem letnio-jesiennym oraz co najmniej dwukrotnie w czasie jego trwania. Zabiegi te mają na celu zmniejszenie zagrożenia zakażenia chorobami pasożytniczymi, odzwierzęcymi oraz zakaźnymi. Jest to tylko zalecenie, nie ma przepisów sanitarno-epidemiologicznych przez co Państwowa Inspekcja Sanitarna nie przeprowadza kontroli tak jak ma to miejsce np. w przypadku kąpielisk. Warto również zaznaczyć, iż norma PN-EN 1176:2009 [69] dotycząca placów zabaw nie określa właściwości piasku wykorzystanego do wypełnienia piaskownic. Jest zawarta jedynie adnotacja, która dotyczy granulacji piasku. Wielkość ziarna powinna mieścić się w przedziale od 0,2 do 2 mm, ponadto nie może zawierać cząstek pyłowych i iłowych. W 2003 roku została stworzona klasyfikacja wg Zmysłowskiej, dzięki której piasek w piaskownicach pod względem liczebności bakterii można zakwalifikować do czterech grup. Jeśli liczba bakterii nie przekracza 10^6 [jtk·g^{-1}] piasek uznawany jest za czysty, jeśli liczba mieści się w granicach $1–2{,}5 \cdot 10^6$ [jtk · g^{-1}] piasek określany jest jako średnio zanieczyszczony, z kolei za piasek zanieczyszczony uznaje się taki, z którego izoluje się od $2{,}5 \cdot 10^6$ do $10 \cdot 10^6$ [jtk · g^{-1}], natomiast przekroczenie tej wartości oznacza, iż piasek jest mocno zanieczyszczony. Również według Zmysłowskiej występowanie grzybów w badanym piasku jest uzasadnione, gdy obecne są zanieczyszczenia organiczne, z kolei pojawienie się *E. coli* świadczy o świeżym zanieczyszczeniu fekalnym piasku [90].

3. Bakterie *E. coli* i *S. aureus* jako potencjalny czynnik zagrożenia mikrobiologicznego

Bakteria *E. coli* została po raz pierwszy opisana w 1885 przez austriackiego pediatrę Teodora Escherichia, który prowadził badania nad kałem niemowląt [25]. Bakteria ta należy do rzędu *Enterobacteriales*, rodziny *Enterobacteriaceae* oraz rodzaju *Escherichia*. Około 120–160 mln lat temu *Escherichia* i *Shigella* wyodrębniły się od wspólnego przodka, zdarzenie to zbiegło się w czasie z pojawieniem ssaków [61]. Bakteria ta posiada zdolność do wymiany materiału genetycznego nie tylko w obrębie rodzaju *Escherichia*, ale także z innymi gatunkami takimi jak *Salmonella* spp., *Shigella* ssp. [66]. *E. coli* to Gram-ujemna, zdolna do ruchu, bakteria urzęsiona perytrichalnie, nie produkująca spor. Jest fakultatywnym anaerobem mającym zdolność do metabolizowania tlenu oraz przeprowadzania fermentacji, dlatego uważana jest za pierwszy organizm, który skolonizował przewód pokarmowa niemowląt. Optymalna temperatura wzrostu *E. coli* to około 37°C, ale występują również szczepy potrafiące rosnąć nawet w temperaturze przekraczającej 49°C. Bakteria ta jest zdolna do podziałów co 30 minut. Komórka *E. coli* składa się w 55% z białek, 25% kwasów nukleinowych, 9% lipidów, 6% to ściana komórkowa, 2,5% glikogen natomiast 3% to pozostałe metabolity [58]. Szerokość komórki to 0,5 µm, natomiast długość to 1–3 µm. Komórki *E. coli* mogą być dłuższe gdy nastąpi insercja Tn10 w genach *ybdN* oraz *ybdM*, przy zachowaniu aktywności metabolicznej oraz zdolności do podziałów [22]. *E. coli* posiada plastyczny genom. Jest on zapewniony przez utrzymanie równowagi między rdzeniem genomu, czyli stałym zestawem genów odpowiadających za podstawowe procesy życiowe oraz ruchomą pulą genów, odpowiadającą za przystosowanie mikroorganizmów do środowiska. Elementy te mogą być przenoszone na inne bakterie podczas horyzontalnego transferu genów (HGT), a platformami niosącymi są ruchome elementy genetyczne [5]. Właśnie podczas tego procesu *E. coli* może nabrać zdolność do produkcji toksyn Shiga, bardzo podobnych do tych, które produkuje *Shigella* spp. [66]. *E. coli* ma wysoce zorganizowany genom, posiada pozostałości po fagach oraz sekwencje insercyjne, a co więcej cechuje się wysoką zdolnością transportową w obrębie cytoplazmy. W 1997 roku zsekwencjonowano pierwszy genom ze szczepu *E. coli* K-12. Zawiera on pojedynczą, okrągłą cząsteczkę składającą się z 4 639 221 par zasad, gdzie 87,8% to regiony kodujące białka, 11% sekwencje regulatorowe genów oraz inne funkcyjne, 0,8% regiony kodujące stabilne RNA oraz 0,7% niekodujących elementów powtórzeniowych. Około 34% (1431) białek nie ma jeszcze zdefiniowanych funkcji, ale istnieje prawdopodobieństwo, że mogą brać udział w szlakach molekularnych [Hu i in. 2009]. Naturalnym miejscem bytowania *E. coli* jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt. Występują również patogenne szczepy *E. coli*, które ze względu na miejsce infekcji zostały podzielone na dwie grupy. Pierwsza z nich to grupa powodująca zakażenia oraz zespoły chorobowe w przewodzie pokarmowym IPEC (intestinal pathogenic *E. coli*). Druga grupa to organizmy powodujące choroby w innych układach niż przewód pokarmowy są nazywane pozajelitowymi szczepami EXPEC (extra-intestinal *E. coli*). Większość patogennych szczepów przenosi się drogą fekalno-oralną z materiałów spożywczych, wody, zwierząt oraz środowiska. W zależności od patotypu *E. coli* może powodować wodnistą, śluzowatą lub krwawą biegunkę, skurcze brzuszne, infekcje dróg moczowych, a w najcięższych przypadkach zapalenie opon mózgowych. Wyróżniono 6 patogennych szczepów *E. coli* są to szczepy: enterotoksynogenne (ETEC), enteropatogenne (EPEC), enteroinwazyjne (EIEC), enteroagregacyjne (EAEC), enterokrwotoczne (EHEC), adherencyjne (DAEC). Szczep uropategenny (UPEC) powoduje zakażenia układu moczowego, natomiast szczep NMEC (neonatal meningitis *E. coli*) jest związany z zapaleniem opon mózgowych, które rozpoczyna się od infekcji

krwi dzięki czemu bakterie zyskują dostęp do centralnego układu nerwowego [36]. *E. coli* są powszechnie wykorzystywane jako bakterie wskaźnikowe przy wykrywaniu zanieczyszczeń pochodzenia fekalnego. Obecność tych bakterii odnotowano także w piaskownicach. W pracy Gotkowskiej-Pachty i Korzeniowskiej [31] zostały zaprezentowane wyniki badań liczebności bakterii m.in. *E. coli* oraz *S. aureus*, a także pleśni i drożdży. Analizy przedstawiają stopień skażenia mikrobiologicznego piasku w piaskownicach na terenie Olsztyna. Łącznie poddano analizie piasek z 16 piaskownic w tym 4 piaskownic znajdujących się na terenie przedszkoli. Pozostałe 12 to piaskownice dostępna w parkach oraz na osiedlach. W pracy uwzględniono także obecność i brak ogrodzenia piaskownic. Zaobserwowano, iż piaskownice na obszarze ogrodzonym oraz te zlokalizowane w okolicy nieopodal drzew były mniej zanieczyszczone niż piasek zebrany z piaskownic nieogrodzonych. Odnotowano ilość *E. coli* mieszczący się w przedziale od 0 do $2{,}1 \cdot 10^3$ jtk $\cdot$ g^{-1}, najwięcej kolonii odnotowano podczas analiz w czerwcu. Bakteria ta była izolowana tylko sporadycznie, ale w miejscach gdzie występowały pałeczki okrężnicy pojawiały się również izolaty *Salmonella* sp. Z kolei w 42 piaskownicach na terenie Krakowa ilość bakterii kałowych mieściła się w przedziale od 10 do $3{,}36 \cdot 10^4$ jtk $\cdot$ g^{-1} [24]. Również austriaccy naukowcy przebadali w lipcu 45 publicznych piaskownic znajdujących się w Grazu pod kątem obecności bakterii z grupy coli oraz *E. coli*. Odnotowano, iż pałeczka okrężnicy zasiedla 49% badanych piaskownic. Otrzymane wyniki mieszczą się w przedziale $2{,}6 \cdot 10^2$ do $3{,}0 \cdot 10^3$ jtk $\cdot$ g^{-1} [4]. Przeprowadzono również analizę stanu higienicznego dziesięciu piaskownic znajdujących się w parkach oraz na osiedlach w Tarnowie [53]. Badania prowadzono w okresie od maja do lipca. Pałeczka okrężnicy została zidentyfikowana w każdej z badanych piaskownic. Liczba bakterii *E. coli* mieściła się w przedziale od 0 do 700 jtk. Najwięcej bakterii odnotowano podczas analiz w czerwcu. Obecność *E. coli* w piaskownicach jest zwykle spowodowana odchodami zwierząt, które w 1 gramie mogą nieść od $2{,}3 \cdot 10^7$ (kał psów) do $7{,}9 \cdot 10^7$ (kał kotów) bakterii [63]. Z kolei nasłonecznienie wpływa na spadek liczebności *E. coli*. Do piaskownic pozbawionych zadaszenia dociera więcej promieni słonecznych, które efektywnie mogą obniżyć ilość występujących w piasku *E. coli* [9]. W ciągu ostatniej dekady pojawienie się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród *Enterobacteriaceae*, częste nadużywanie antybiotyków zarówno u ludzi, w celach leczniczych jak i u zwierząt jako dodatek do pasz [19], doprowadziło do ograniczenia możliwości leczenia w przypadku zakażeń wywołanych bakteriami tej rodziny i zostało uznane za poważny problem sięgający skali globalnej [12, 83]. Austriaccy naukowcy nie wykryli izolatów *E. coli* opornych na działanie aztreonamu, ceftazydymu, imipenemu oraz meropenemu, Co więcej wyniki uzyskane w Austrii przedstawiają stuprocentową wrażliwość na amikacynę, cefepin, cefotaksym, gentamycynę. Najwyższą oporność sięgającą 12% odnotowano dla ampicyliny, z kolei drugi najwyższy procent oporności wynoszący 10,4% odnotowano dla pipercyliny, a dla amoksycyliny/kwasu klawulanowego oporność wynosiła 9,4%. Natomiast dla tetracykliny odnotowano 6,3% odporność, a dla cefuroksymu 3,1%. W badaniach tych nie wykryto szczepów *E. coli* zdolnych do produkcji β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym [4].

Z kolei *S. aureus* jest Gram-dodatnią, kulistą bakterią zidentyfikowaną w 1884 roku [30]. Podczas obserwacji pod mikroskopem świetlnym często można zaobserwować skupiska w charakterystycznym kształcie kiści winogron. Nazwa *Staphylococcus* wywodzi się z greki, gdzie *staphyle* oznacza kiść winogron, a *kokkos* to jagoda, natomiast *aureus* z łaciny oznacza złoto [44]. Podczas obserwacji pod skaningowym mikroskopem elektronowym *S. aureus* ma kształt bardziej sferyczny, można również dostrzec gładką powierzchnię bakterii [32]. Średnica komórek waha się od 0,5 do 1,0 µm. Transmisyjna mikroskopia elektronowa pozwala zaobserwować grubą ścianę komórkową, charakterystyczną błonę komórkową oraz amorficzną cytoplazmę [79]. *S. aureus* może żyć zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Na podłożu agarowym, bogatym w składniki odżywcze tworzy żółte lub białe kolonie o dużej średnicy. Żółty kolor pochodzi od syntetyzowanych przez tą bakterię karotenoidów [46]. Organizm ten jest zdolny do produkcji katalazy, toleruje także wysokie stężenia soli (7,5% NaCl) [8]. Kilkadziesiąt lat temu *S. aureus* był wiodącym patogenem szpitalnym, wywołującym poważne infekcje w niektórych przypadkach kończące się nawet zgonem na szpitalnych oddziałach intensywnej terapii, niestety obecnie wraz z szerzącym się wzrostem lekoopornych szczepów *S. aureus* obecny jest także poza murami szpitala stając się niezwykle niebezpieczną bakterią. Co gorsza zdolność *S. aureus* do nabywania lekooporności na wiele klas antybiotyków sprawiła, że jest bardzo trudnym do leczenia patogenem. Proces infekcji gronkowcem złocistym obejmuje 5 stadiów. Pierwszy etap to kolonizacja, drugi to infekcja lokalna, trzeci rozsiewanie bakterii i/lub sepsa, czarty to infekcje przerzutowe i ostatnie stadium to toksykoza [30]. Należy zaznaczyć, iż znaczna część społeczeństwa 25–30% jest tylko nosicielami *S. aureus* w jamie nosowo-gardłowej, który sporadycznie powoduje ciężkie infekcje [50]. Przejście ze stanu nosicielstwa do kolonizacji ma miejsce, w szczególnych przypadkach po długotrwałej hospitalizacji, poważnym zabieg, po stosowaniu leków antysupresyjnych oraz przy chronicznych chorobach metabolicznych. *S. aureus* wywołuje wiele poważnych i ciężkich do leczenia chorób zakaźnych.

Ważne kliniczne infekcje *S. aureus* to infekcyjne zapalenie wsierdzia, infekcje skóry i tkanek miękkich, infekcje kostno-stawowe i infekcje opłucnej i płucnej. Inne stany zapalne to ropień zewnątrzoponowy, zapalenie opon mózgowych, wstrząs toksyczny i infekcje dróg moczowych. Zakażenie ze względu na pochodzenie infekcji zostały podzielone na dwie grupy zakażenia społeczne i szpitalne. Te dwa typy są odmienne pod względem lekooporności, a także tła genetycznego [30]. Gronkowiec złocisty w próbkach piasku z Olsztyna pojawiał się niezależnie od czasu poboru jak i miejsca. Odnotowano tylko od 0 do 5 jtk $\cdot g^{-1}$ *S. aureus* podczas analiz przeprowadzonych w lipcu [31]. Z kolei analizy piasku z Krakowa wykryły od 0 do $5{,}1 \cdot 10^2$ jtk $\cdot g^{-1}$ *Staphylococci* [24]. W badania prowadzonych na terenie Tarnowa odnotowano wartości średnie jtk mieszczące się w przedziale od $1{,}10 \cdot 10^2$ do $2{,}67 \cdot 10^3$ jtk $\cdot g^{-1}$ [53]. Najwyższe wartości jtk odnotowano podczas analizy w czerwcu. Tak wysokie zanieczyszczenie mikrobiologiczne jest alarmujące, ponieważ piaskownice nie są naturalnym miejscem bytowania *S. auresu*. Wzrost *S. aureus* jest zależy od wielu czynników środowiskowych takich jak temperatura, wilgotność, nasłonecznienie, pH oraz dostępności składników pokarmowych [24]. Piasek spełnia wszystkie te wymogi, dlatego wzrost *S. aureus*, który odnotowano jest wysoki. Co więcej bakterie te stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego co spowodowało podwyższone zainteresowanie nowymi siedliskami ich bytowania [75]. *S. aureus* jest przyczyną poważnych, a niekiedy zagrażającym życiu infekcjom. Oporność na metycylinę wśród szczepów gronkowców pojawiła się zaledwie rok po wprowadzeniu do leczenia tego antybiotyku w Anglii w 1961 roku [35]. W ciągu ostatnich lat częstotliwość występowania szczepów opornych na metycylinę znacznie wzrosła, a to za sprawą zakażeń MRSA nabytych przez społeczeństwo (community-acquired MRSA) [21]. Około 90% zakażeń CA-MRSA to infekcje skóry lub tkanek miękkich, ale zdarzają się przypadki bardziej poważnych, a niekiedy nawet śmiertelnych zakażeń [21, 56]. Na podstawie tych danych można wnioskować, iż oporność *S. aureus* izolowanego z piasku jest alarmująca.

4. Charakterystyka antybiotyków

4.1. Grupy antybiotyków

Aminoglikozydy – to związki bakteriobójcze skuteczne przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Należą do niskocząsteczkowych związków chemicznych. W swojej budowie zawierają aminocukier połączony wiązaniem glikozydowym z pierścieniem heksozy, najczęściej w postaci streptaminy, streptydyny bądź 2-deoksystreptaminy. Większość antybiotyków z tej grupy jest pochodzenia naturalnego, produkowana przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces* oraz *Micromonospora*. Najpopularniejszym związkiem z grupy aminoglikozydów jest amikacyna [62].

Ansamycyny – posiadają szerokie spektrum substratowe wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnym. Rifampicynę B – pierwszy antybiotyk z tej grupy otrzymano z promieniowca *Nocardia mediterranei*. Najpopularniejszym przedstawicielem jest rifampicyna RMP, będąca półsyntetyczną pochodną rifampicyny B, wprowadzona do leczenia w 1967 roku. Działa bakteriobójczo na *Mycobacterium leprae* (prątki trądu), a także *Mycobacterium tuberculosis* (prątki gruźlicy) poprzez hamowanie polimerazy RNA bakterii [80]. Przyjmowanie rifampicyny powoduje, w okresie stosowania, występowanie czerwonego moczu u pacjenta oraz pomarańczowego zabarwienia płynów ustrojowych np. łez czy potu [51].

Antybiotyki β-laktamowe – ich nazwa pochodzi od cyklicznego amidu kwasowego tj. pierścienia β-laktamowego. Rozerwanie tej struktury skutkuje utratą właściwości antybiotycznych [51]. Mechanizm działania β-laktamów polega na blokowaniu transpeptydaz – kluczowych enzymów biorących udział w syntezie peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii [57]. β-laktamy wykazują wyższą skuteczność terapeutyczną w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Mają niewielki wpływ na bakterie Gram-ujemne ze względu na obecność otoczki zbudowanej z lipopolisacharydów, która ochrania cienką ścianę komórkową [72]. Jest to pierwsza grupa antybiotyków, która została odkryta i wprowadzona do leczenia. Była powszechnie stosowana podczas terapii ze względu na łatwą dostępność, niską cenę jak również brak ubocznych efektów działania. To przyczyniło się do oporności dużej liczby bakterii na tą grupę antybiotyków. Kiedy problem braku wrażliwości na penicylinę, który miał miejsce stosunkowo szybko po jej odkryciu i wprowadzeniu do leczenia, stał się poważny opracowano syntetyczne antybiotyki β-laktamowe np. ampicylina, amoksycylina oraz metycylina. Został również odkryty naturalny antybiotyk z tej grupy – cefalosporyna (pierwszej generacji) stosowana przeciwko Gram-dodatnim ziarniakom, w znacznie mniejszym stopniu działająca na Gram-ujemne pałeczki. Natomiast druga oraz trzecia generacja cefasporyn wykazuje wyższą skuteczność przeciwko Gram-ujemnym bakteriom. Z kolei czwartą generację cechuje szerokie spektrum substratowe wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. W cefalosporynach piątej generacji medycyna pokłada ogromne nadzieje w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy wielolekooporne. Do grupy β-laktamów należą również karbapenemy o szerokim spektrum działania oraz monopenemy, do których zaliczany jest aztreonam, aktywny wobec tlenowych bakterii Gram-ujemnych

[28]. Do syntezy β-laktamow są zdolne grzyby *Penicillium* sp., *Cephalosporium* sp. oraz *Aspergillus* sp., jak również promieniowce i bakterie z rodzajów *Streptomyces*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Nocardia* oraz *Pseudomonas* [51].

Chinolony – to antybiotyki wzbudzające spore zainteresowanie już od ponad 40 lat, kiedy zostały zsyntetyzowane. Jest to grupa związków, która przez lata była doskonalona, aby lepiej zrozumieć mechanizm działania, poprawić zdolność modyfikowania jądra chinolonu w celu zwiększenia siły działania i spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, uzyskać możliwość wydłużenia okresu półtrwania w fazie eliminacji oraz poprawić właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, po to aby skuteczne okazało się dawkowanie raz na dobę, a także zrozumieć znaczenie zależności struktura-aktywność chinolonów pod względem podatności na rozwój oporności bakterii i możliwości wywoływania efektów niepożądanych u leczonych pacjentów. Związki te są wysoko mutagenne, co przyczyniło się do pojawienia dużej ilości opornych na ich działanie szczepów. W celu uzyskania nowej grupy związków i obniżenia częstotliwości pojawiania się opornych szczepów wprowadzono fluor do cząsteczki antybiotyku. Nową grupę nazwano fluorochinolonami. Niektóre z pierwszych chinolonów wchodziły w interakcję z teofiliną i kofeiną oraz związkami chinolonowymi mającymi fluor w pozycji C-8 co przyczyniało się do pojawiania fototoksyczności od umiarkowanej do ciężkiej, ponieważ gromadziły się w wysokich stężeniach w skórze. Fototoksyczność przejawia się częściej przy stosowaniu lewosklodacyny, fleroksacyny i sparfloksacyny, natomiast jest znacznie rzadsza podczas stosowania ofloksacyny oraz cyprofloksacyny [3].

Fusydany – antybiotyki steroidowe otrzymywane z grzyba *Fusidium coccineum*. Najpopularniejszym przedstawicielem tej grupy jest kwas fusydowy, stosowany przeciwko *S. aureus*. Hamuje on syntezę białek bakterii, ale podczas leczenia szybko dochodzi do selekcji szczepów opornych na jego działanie, dlatego zaleca się łączoną terapie z wankomycyną [51]. Najlepiej poznanym mechanizmem odporności na kwas fusydowy jest mutacja w genie *fusA*, kodującym białka translokazy i czynnika elongacyjnego EF-G. Odporność może wynikać również z horyzontalnego transferu genu *fusB* związanego z plazmidem, którego białka chronią układ translacyjny bakterii przed działaniem antybiotyku [16]

Grupa MLS – makrolidy, linkozamidy, streptograminy – każda z wymienionych podgrup cechuje się inną budową, ale mają wspólny mechanizm działania, ponieważ przyłączają się one do podjednostki 50S rybosomu [51]. Działanie to prowadzi do dysocjacji tRNA, co uniemożliwia wydłużenie łańcucha peptydowego, a w konsekwencji zaburza syntezę białka i hamuje wzrost bakterii. Makrolidy w swojej budowie posiadają pierścień laktonowy, są związkami 14 – węglowymi (erytromycyna, roksytromycyna, klarytromycyna) oraz 16 – węglowymi (spiramycyna). Funkcjonuje również podział makrolidów na generacje – do I zalicza się pierwszy, wzorcowy antybiotyk tej grupy – erytromycynę oraz generację II do której należą nowe antybiotyki (azytromycyna, klarytromycyna, roksytromycyna, spiramycyna, tobramycyna). Makrolidy są jednymi z najczęściej stosowanych antybiotyków, gdyż posiadają szerokie spektrum substratowe obejmujące Gram-dodatnie ziarniaki oraz Gram-ujemne pałeczki. Najczęściej stosowanym antybiotykiem z tej grupy jest erytromycyna, uważana za bezpieczny lek, gdyż bardzo rzadko powoduje reakcje alergiczny. Do najczęstszych efektów ubocznych należą zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego [41]. Linkozamidy (klindamycyna i linkomycyna) w przeciwieństwie do makrolidów są pozbawione pierścienia laktonowego. Do tej grupy zaliczana jest linkomycyna oraz jej chlorowcowa pochodna klindamycyna [51]. Ta podgrupa jest głównie aktywna wobec bakterii Gram-dodatnich, stosowana również przeciwko wybranym beztlenowcom Gram-ujemnym. Wykazano także, iż linkozamidy są skuteczne wobec *S. aureus*, niestety bakteria ta stała się oporna na ich działanie poprzez modyfikacje i/lub mutacje w rRNA [54]. Do grupy streptogramin zaliczane są pristynamycyna, mająca zastosowanie przy leczeniu rzeżączki, piostacyna będącą skutecznym lekiem przeciwko dwoince zapalenia płuc oraz wirginiamycyna, która jest dodatkiem do pasz [51].

Sulfonoamidy – jest to klasa antybiotyków, w której grupa funkcyjna jest bezpośrednio związana z częścią aromatyczną, heterocykliczną, alifatyczną lub cukrową. Może być również dołączona do tej części za pomocą heteroatomu, najczęściej tlenu lub azotu, co prowadzi do powstania odpowiednio sulfaminianów i sulfamidów [76].

Tetracykliny – cechują się szerokim spektrum substratowym wobec bakterii Gram-dodatnim oraz Gram-ujemnych. Pierwsze odkrycia dotyczące tetracyklin sięgają lat 40. XX wieku. Są one syntetyzowane przez *Streptomyces aureofaciens* oraz *S. rimosus*. Najnowszym antybiotykiem tej grupy jest tigecyklina, będąca syntetycznym analogiem minocykliny powstałym poprzez wprowadzenie w pozycję C-9 grupy t-butyloglicyloamidowej. Zabieg ten spowodował rozszerzenie zakresu działania przeciwbakteryjnego, jak również spowodował nabycie zdolności do przełamywania oporności na wszystkie antybiotyki tetracyklinowe. Działanie bakteriobójcze związane jest z wiązaniem antybiotyku do obu podjednostek rybosomów (w większym stopniu do podjednostki 30S) oraz mRNA co skutkuje blokowaniem syntezy białek. Obecnie stosowanie tego antybiotyku spadło, ponieważ wiele bakterii uodporniło się na jego działanie [51].

4.2. Mechanizmy działania antybiotyków

W celu stworzenie nowej klasy antybiotyków niezbędne jest dokładnie poznanie celów komórkowych leków oraz mechanizmu działania obronnego bakterii skierowanego na dany lek. Od lat prowadzi się badania mające na celu odkrycie tych czynników. Dotychczas poznano następujące schematy działania antybiotyków [42]:

– blokowanie syntezy ściany komórkowej

Różne klasy antybiotyków działają na poszczególne etapy tego procesu. Przykładem są antybiotyki β-laktamowe, blokują one transpeptydazę (białka PBP), która łączy oligonukleotydy zawierające D-alanylo-D--alaninę. Proces ten jest ostatnim etapem syntezy ściany komórkowej mającym na celu sieciowanie peptydoglikanu. D-alanylo-D-alanina jest również substratem dla antybiotyków z klasy glikopeptydów, po związaniu się białka z antybiotykiem następuje zablokowanie dostępności D-alanylo-D-alaniny dla kolejnych etapów syntezy [1]. Na syntezę ściany komórkowej bakterii działa również izoniazyd. Jest on inhibitorem szlaku syntezy kwasów mykolowych stanowiący niezbędny element ściany komórkowej prątków gruźlicy przeciwko którym znalazł zastosowanie [73]. Także jeden z najnowszych antybiotyków – tejksobaktyna hamuje syntezę ściany komórkowej poprzez wiązanie się z silnie konserwowanym motywem lipidu II (prekursor peptydoglikanu) i lipidu III (prekursor kwasu tejchojowego ściany komórkowej) [45].

– zaburzanie funkcjonowania błony komórkowej

Przykładem jest zaburzenie szczelności błony powodowane przez antybiotyki polipeptydowe posiadające specyficzną strukturę, która umożliwia im łączenie się z lipidowymi składnikami błony komórkowej. Ponadto są to peptydy kationowe, zdolne do depolaryzacji ujemnie naładowanej błony komórkowej [47]. Również depomycyna, antybiotyk po raz pierwszy zsyntetyzowany w latach 80. XX. wieku, ale zastosowany dopiero w 2003, zaburza funkcjonowanie błony komórkowej bakterii na drodze wiązaniu monomerów bądź oligomerów do błony komórkowej, następnie ich polimeryzacji – co skutkuje utworzeniem w błonie kanału, przez który wypływa zawartość komórki. Proces ten jest zależny od jonów wapnia [77].

– zaburzenie syntezy białek bakteryjnych

Zaburzenie syntezy białek bakteryjnych to najbardziej rozpowszechniony cel dla działania antybiotyków. Istnieje stosunkowo duża liczba związków blokujących syntezę białek bakteryjnych na różnych etapach począwszy od inicjacji translacji aż po prawidłowe wydłużanie łańcucha polipeptydowego. Do tej grupy należą aminoglikozydy, makrolidy czy tetracykliny. Z racji tego, iż liczba związków jest tak duża, istnieje także wiele mechanizmów działania, z których najpopularniejszy to wiązanie się cząsteczek leku do różnych cząsteczek białek rybosomalnych lub rybosomalnego RNA (podjednostki 30S oraz 50S). Mechanizm działania aminoglikozydów polega na wiązaniu się antybiotyku z podjednostką 30S rybosomu oraz zakłóceniu interakcji kodonu z mRNA z antykodonem w tRNA rybosomy. Z kolei tetracykliny blokują podjednostkę 30S, a także hamują wydłużanie łańcucha polipeptydowego. Natomiast makrolidy, linkozamidy są inhibitorami podjednostki 50S. Zakłócają proces transpeptydacji oraz translokacji, co skutkuje hamowaniem biosyntezy białek bakteryjnych [42].

– zaburzenie syntezy DNA

Chinolony oraz ich pochodne fluorochinolony (II i III generacja leków), a także naftyrydynochinolony to podstawowa grupa związków zaburzających syntezę DNA. Ich działanie przyczynia się do fragmentacji DNA w komórce. Dzieje się tak ponieważ związki te są specyficznymi inhibitorami domen ligazy topoizomerazy II (gyrazy) oraz topoizomerazy IV. Efektem aktywności domen nukleolitycznych, bez działania ligazy, jest fragmentacja kwasu deoksyrybonukleinowego [82]. Natomiast antybiotyki będące pochodnymi nitroimidazolu, działają po wniknięciu do komórki bakterii beztlenowej. W wyniku przeprowadzenia reakcji redox, wytwarzana jest cytotoksyczna pochodna wiążąca się z DNA, w efekcie czego nić ulega fragmentacji, a to prowadzi do śmierci komórki [48].

– zaburzenie syntezy RNA

Prócz związków wpływających na syntezę oraz czas półtrwania DNA istnieje grupa związków, których celem jest zaburzenie syntezy RNA. Należy do nich powszechnie znana ryfampicyna, blokująca bakteryjną polimerazę RNA poprzez trwałe wiązanie się z jej podjednostką β. Antybiotyk wiąże się w pobliżu miejsca aktywnego specyficznie do bakteryjnej polimerazy RNA, co uniemożliwia wydłużenie łańcucha DNA [14].

– inhibicja szlaków metabolicznych

Działanie hamujące na wzrost bakterii można również osiągnąć poprzez zaburzenie aktywności ważnych szlaków metabolicznych. Jednym z przykładów jest zahamowanie syntezy kwasu foliowego, co skutkuje zaburzeniem syntezy DNA. Mechanizm ten obserwowany jest w działaniu sulfonamidów, które zastępują kwas p-aminobenzoesowy. W przypadku trimetoprimu hamowana jest bakteryjna reduktaza kwasu dihydrofoliowego. Obserwowany jest również mechanizm blokowania syntezy ATP poprzez wiązanie się z podjednostką C syntazy ATP przez chinoliny [42].

– **blokowanie przebudowy ściany komórkowej podczas wzrostu**

Początkiem 2020 roku doniesiono o nowej aktywności biologicznej dwóch substancji, które charakteryzują się innowacyjnym mechanizmem działania. Związki te to przedstawiciele nowej klasy funkcjonalnej antybiotyków glikopeptydowych komplestatyny, poznanego antybiotyku glikopeptydowego oraz nowo odkrytego związku, korbomycyną. Nowy sposób działania polega na wiązaniu się z peptydoglikanem. Antybiotyki te blokują działanie autolizyn – niezbędnych hydrolaz peptydoglikanu, które są wymagane do przebudowy ściany komórkowej podczas wzrostu. Jak donoszą badania prowadzone na mysim modelu zakażenia skóry MRSA korbomycyna i komplestatyna mają niski poziom rozwoju oporności i skutecznie zmniejszają obciążenie bakteriami podczas tej infekcji [18].

5. Oporność bakterii na antybiotyki

Problem lekoopornych szczepów został przewidziany przez samego odkrywcę pierwszego antybiotyku stosowanego w leczeniu chorób bakteryjnych – penicyliny, Aleksandra Fleminga. Zaledwie kilka lat po wypowiedzeniu tej hipotezy stała się ona tezą i już w latach 50. XX wieku zaobserwowano oporne na działanie penicyliny szczepy *S. aureus*. Jednak problem lekooporności nie pojawił się w poprzednim stuleciu, lecz zdecydowanie wcześniej. Jak donoszą ostatnie badania geny oporności na kilka klas antybiotyków zostały odnalezione w wiecznej zmarzlinie liczącej 30 tysięcy lat, prekolumbijskiej mumii z Peru oraz w jamie ustnej średniowiecznego szkieletu [68]. Oporność bakterii na antybiotyki jest zatem procesem ukierunkowanej ewolucji wywołanej presją selekcyjną oraz wymianą materiału genetycznego między bakteriami w procesie horyzontalnego transferu genów. Niestety selekcja jest spowodowana głównie działalnością człowieka, będącą efektem niewłaściwego stosowania antybiotyków, ich nadużywania w nieodpowiednich dawkach oraz wprowadzania do pasz [42]. Istnieją cztery główne mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki. Pierwszy z nich to ograniczenie przyjmowania leku, drugi to modyfikowanie celu leku, trzeci to dezaktywacja leku i czwarty to aktywny wyrzut leku. Mechanizmy te są zlokalizowane na chromosomie bakteryjnym, ich obecność jest wrodzona u wszystkich członków gatunku, bądź też mogą być nabyte i pochodzić od innych bakterii, zwykle przekazywane za pośrednictwem plazmidu. Geny samoistnej oporności mogą ulegać konstytutywnej ekspresji, ekspresja może być również wywołana obecnością leków przeciwdrobnoustrojowych. Szczególnie bakterie Gram-ujemne szeroko wykorzystują wszystkie wyżej wymienione mechanizmy. Wynika to ze zdolności do horyzontalnego transferu genów oporności [72]. Poniżej omówiono szczegółowo wybrane mechanizmy oporności bakterii z gatunków *E. coli* i *S. aureus* na antybiotyki.

Oporność na antybiotyki jest obecnie jednym z największych globalnych zagrożeń dla zdrowia człowieka. Może dotknąć każdego, niezależnie od wieku oraz od miejsca, w którym żyje. Chociaż oporność na antybiotyki występuje u drobnoustrojów naturalnie, nadużywanie i niewłaściwe ich stosowanie u ludzi i zwierząt przyspiesza rozprzestrzenianie się genów lekooporności. Oczywiście można podjąć kroki, mające na celu ograniczenie szerzącej się oporności. Po pierwsze należy uświadomić społeczeństwo, iż możliwe jest zapobieganie infekcjom poprzez dobrą higienę i szczepienia, stosowanie antybiotyku tylko wtedy gdy jest to uzasadnione działanie zalecone przez pracownika służby zdrowia, jak również stosowanie się do zaleconych dawek oraz nie dzielenie się przepisanymi antybiotykami z innymi osobami oraz nie zażywanie antybiotyków, które pozostają po poprzedniej terapii, mogą bardzo ograniczyć rozprzestrzenianie się antybiotykooporności. Ludzie powinni zrozumieć problem i poznać sposoby na zmianę swojego postępowania.

Klinicyści oraz świat nauki od dawna doskonale wiedzą, że bakterie oraz grzyby, stają się alarmująco oporne na leki stosowane w ich leczeniu. Natomiast reakcja społeczeństwa na to złożone, bardzo poważne zagrożenie dla zdrowia – powszechnie określane mianem „oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe" – wymaga zaangażowania znacznie szerszej grupy podmiotów począwszy od rządów, organów regulacyjnych i społeczeństwa, aż po ekspertów w dziedzinie zdrowia, żywności, środowiska, ekonomii, handlu i przemysłu. Ludzie z tych środowisk powinni wymieniać swoje spostrzeżenia oraz obawy, aby społeczeństwo zrozumiało powagę problemu. Terminologia używana do opisania problemu jest często źle rozumiana, niepoprawnie interpretowana, a także obciążona nieprzydatnymi konotacjami [55]. W ankiecie przeprowadzonej na blisko 10 000 osób, w 12 krajach (Nigeria, Południowa Afryka, Meksyk, Barbados, Indonezja, Indie, Rosja, Serbia, Egipt, Sudan, Chiny oraz Wietnam) przez WHO dowiedziono, iż 14% respondentów nie zna terminów: antybiotykooporność, lekooporność, lekooporna bakteria, superbakteria, oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz AMR (antimicrobial resistance). Mniej niż połowa respondentów słyszała o „oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe", z kolei tylko 20% badanych było świadomych co oznacza skrót „AMR" [85]. Wyniki ankiety WHO pokazują, że chociaż ludzie rozpoznają problem, ale nie rozumieją w pełni, nie wiedzą co go powoduje ani co mogą sami zrobić, aby problem nie narastał. WHO pokazało jak dużo jeszcze należy zrobić, aby społeczeń-

stwo stało się bardziej świadome. Wyniki pytań ankietowych na blisko 10 000 respondentów na temat stosowania antybiotyków pokazują, jak często przyjmuje się antybiotyki. Znaczna większość ankietowanych, aż 65% w 12 krajach zgłosiło, że stosowała je w ciągu ostatnich sześciu miesięcy. Ta częstotliwość ma duże znaczenie, zagraża zdrowiu, ponieważ przyczynia się do wzrostu liczby lekoopornych szczepów bakterii na całym globie, w stosunkowo krótkim czasie sześciu miesięcy. Z kolei 32% respondentów przestaje używać antybiotyki w momencie, gdy poczuje się lepiej, tym samym nie stosując się do zaleceń WHO, które mówią, iż powinien być przyjęty cały cykl leku wypisanego przez lekarza na daną liczbę dni, po to aby nie faworyzować szczepów posiadających geny oporności. Problem nie leży tylko po stronie pacjentów, badania dowiodły, że 64% przypadków to osoby, które otrzymały antybiotyki na infekcje wirusowe. Jak wiadomo antybiotyki stosuje się przeciwko infekcjom wyłącznie bakteryjnym [85]. Podobne badanie opublikowane także w 2015 roku w Wielkiej Brytanii przez brytyjską organizację charytatywną Wellcome Trust, ujawniło podobne trendy [84]. Niekiedy niewłaściwe użycie terminów przez prasę, naukowców w publikacjach oraz dziennikarzy do opisania zachodzących na świecie wydarzeń może przynosić efekty przeciwne do zamierzonych we wszystkich kontekstach, zamiast uświadamiać wprowadza w błąd. Idealnym przykładem do zobrazowania tego zjawiska jest przemysł spożywczy, a w szczególności produkcja drobiu. W ostatnich latach różne sektory wezwały kraje do stopniowego wycofania lub zniesienia „środków przeciwdrobnoustrojowych" stosowanych w celu promowania wzrostu zwierząt, aby chronić ludzi przed zwiększającym się poziomem opornych na leki bakterii [60]. Jednak z definicji środki przeciwdrobnoustrojowe obejmują leki, które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu obecnego poziomu produkcji drobiu na całym świecie poprzez zmniejszenie zapalenia jelit wywołanego przez pasożyty kokcydia. Leki przeciw kokcydiozie nie wywierają wpływu na bakterie i nie powodują oporności bakterii u ludzi i innych zwierząt. Tak więc żądanie zniesienia wszystkich środków przeciwdrobnoustrojowych do promocji wzrostu mija się z celem i może potencjalnie zaszkodzić bezpieczeństwu żywnościowemu. Prosta, jasna i jednoznaczna terminologia pomogłaby zapewnić, iż pojawienie się opornych na leki bakterii powodujących powszechne choroby, wynika z wysokiego użycia przez ludzi antybiotyków. Może to również poprawić zrozumienie i zaangażowanie ludzi. W dniu 16 marca 2017 roku Organizacja Narodów Zjednoczonych utworzyła grupę międzyagencyjną w celu koordynacji walki z lekopornością. Świat nauki postuluje, aby pierwszym z wielu kroków było stworzenie odpowiedniej terminologii przystępnej w swojej popularnonaukowej formie dla wszystkich podmiotów. Takie działanie może poprawić zrozumienie problemu i przyczynić się do powstania spójnej globalnej reakcji [81].

Pojawienie się w środowisku człowieka *E. coli* oraz *S. aureus* może stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Szczególnie narażoną grupą na zakażenia immunologiczne oraz pokarmowe są dzieci, ze względu na nie w pełni rozwinięty system odpornościowy [59]. Co więcej dzieci w wieku przedszkolnym często nie przestrzegają zasad higieny, a także mają skłonności do jedzenia piasku podczas zabawy w piaskownicy (geofagia), co czyni je bardziej podatnymi na infekcje [64]. Piaskownice stanowią poważne zagrożenie jeśli piasek w nich obecny jest zanieczyszczony przez przydomowe zwierzęta wyprowadzane na spacer w obrębie parków czy osiedli jak również gryzonie np. szczury i myszy. Kontakt z takim piaskiem może zakończyć się infekcją w obrębie jelit. Dlatego istotne jest kontrolowanie różnych środowisk i badanie opornych bakterii, aby wyeliminować je z środowiska, w celu zminimalizowania ryzyka rozprzestrzenienia się genów lekooporności

5.1. Oporność pałeczek *Enterobacteriaceae*

Najpopularniejsze mechanizmy oporność wśród bakterii *E. coli*:

a) Mechanizm ESBL (extended-spectrum β-lactamases) występuje u bakterii syntetyzujących β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym czyniącym je opornymi na działanie antybiotyków z grupy β-laktamów [43, 52, 87]. Cechą charakterystyczną wszystkich antybiotyków β-laktamowych jest obecność pierścienia β-laktamu. β-laktamazy, pierwotnie nazywane penicylinazami lub cefalosporynami są zdolne do inaktywacji tej klasy antybiotyków na drodze hydrolizy swoistego miejsca pierścienia β-laktamowego powodując jego otwarcie. Antybiotyk nie może wówczas związać się ze swoim docelowym białkiem PBP. Mechanizm ESBL jest najpowszechniejszy wśród bakterii Gram-ujemnym, czyniąc je opornymi na działanie antybiotyków β-laktamowych [11, 72]. β-laktamazy można sklasyfikować na podstawie ich struktury lub obecności grupy funkcyjnej. Według struktury rozróżniane są cztery grupy A, B, C oraz D. Natomiast według występującej grupy funkcyjnej wyróżnia się cefalosporynazy, seryno-β-laktamazy i metalo-β-laktamazy, które są najczęściej spotykane u *E. coli* [13, 74]. Pierwsza scharakteryzowana β-laktamaza pochodziła z *E. coli*. Kodowana chromosomalnie na genie *ampC* (nazwa pochodzi od oporności na ampicylinę). Gen ten ulega konstytutywnej ekspresji przy niskim poziomie, ale mutacja może powodować jego nadekspresję. β-laktamazy *ampC* są najbardziej skuteczne w stosunku do penicyliny oraz cefalosporyn I generacji. Enzymy te nadały oporność

bakteriom również na kolejne generacje cefalosporyn zostały i nazwane β-laktamazami o rozszerzonym spektrum substratowym – ESBL [10, 11, 74, 78].

b) Produkcja MBL (metallo-β-lactamase) przez bakterie Gram-ujemne. MLB w ostatnich latach stał się najbardziej rozpowszechnionym i klinicznie znaczącym mechanizmem oporności bakterii na karbapenemy [71]. Bakterie zdolne do produkcji MBL mogą hydrolizować szeroki zakres antybiotyków β-laktamowych: cefalosporyn, karbapenemów, cefamycyny, ale nie mają zdolności do hydrolizowania aztreonamu. Co więcej, ich aktywność katalityczna jest neutralizowana przez inhibitory β-laktamazy, takie jak klawulanian, tazobaktam i sulbaktam, które są powszechnie stosowane w terapii antybiotykowej [6]. Metalo-β-laktamazy należą do β-laktamaz klasy B wg klasyfikacji Ambler [2] na podstawie ich homologii sekwencji aminokwasów oraz do grupy 3 zgodnie z klasyfikacją Busha [11] na podstawie profilu substratu i inhibitora. MBL wymagają jonów cynku do katalizowania hydrolizy antybiotyków β-laktamowych, a ze względu na tą zależność od metalu, katalizę MBL można zahamować obecnością czynników chelatujących metal np. kwasem etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) [67]. MBL są kodowane przez geny będące częścią chromosomu lub przez geny nabyte w czasie horyzontalnego transferu genów [17]. Najbardziej rozpowszechnione MBL obejmują imipenemazę (IMP), VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) oraz NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) [67].

c) CRE (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) – szczepy oporne na działanie karbapenemów [52]. Do początku XXI wieku produkcja karbapenemaz przez *Enterobacteriaceae* była nieznana. Po raz pierwszy w 2001 roku doniesiono, iż *Klebsiella pneumoniae* wytwarza karbapenemazy [88]. Oporność na karbapenemy jest kodowana przez gen *bla*KPC. Niestety możliwy jest transfer tego genu do genomu *E. coli*, co może spowodować szerokie i szybkie rozprzestrzenienie się wrażliwości na tę klasę antybiotyków. Wywołało by to poważną w skutkach epidemię na skalę globalną [37].

5.2. Oporność *S. aureus*

Najczęstsze mechanizmy oporność wśród bakterii *S. aureus*:

a) Oporność na penicylinę. Penicylina jest pierwszym antybiotykiem β-laktamowym odkrytym w 1928 r. przez Aleksandra Fleminga i uznanym za skuteczny przeciwko infekcjom wywoływanym przez *S. aureus*. W latach czterdziestych ubiegłego wieku, odnotowano już pierwsze doniesienia o szczepach *S. aureus* opornych na penicylinę [70]. Szczepy te kodowały plazmidowo enzym β-laktamowy penicylinazę, która enzymatycznie tnie pierścień β-laktamowy penicyliny czyniąc antybiotyk nieaktywnym [7, 38]. W latach 50 zeszłego wieku oporność na penicylinę ograniczała się jedynie do izolatów szpitalnych *S. aureus*. Pod koniec 1960 roku, ponad 80% szczepów gronkowca złocistego, niezależnie pochodzenia szpitalnego bądź społecznego, było opornych na penicylinę z powodu plazmidowego transferu genu penicylinazy (*bla*Z) oraz klonalnego rozprzestrzenianie się opornych szczepów [15, 49].

b) MRSA – methicillin-resistant *S. aureus* są to szczepy zwykle oporne na działanie wielu antybiotyków, często będące patogenami szpitalnymi powodującymi wysoką zachorowalność oraz śmiertelność, podnoszącymi koszty leczenia [30]. Metycylina została wprowadzona do leczenia w 1961 jako antybiotyk mający pomóc w leczenie zakażeń wywołanych gronkowcem złocistym opornym na działanie penicyliny. Niestety niespełna rok po wprowadzeniu odnotowano pierwsze szczepy oporne na metycylinę [35]. Przez kolejne lata zgłaszano coraz więcej takich ognisk pojawiających się w placówkach szpitalnych. Stały się one poważnym zagrożeniem zdrowia publicznego, dlatego przystąpiono do intensywnych prac mających na celu odkrycie mechanizmu oporności na metycylinę przez gronkowca złocistego, poznano go 1981 roku [33]. Szczepy MRSA kodują w genie *mecA* dodatkowe białko PBP2a (penicillin binding protein) wiążące penicylinę. Zmienione białko nie wykazuje powinowactwa do tego antybiotyku. Antybiotyki β-laktamowe wykazują działanie antybakteryjne poprzez inaktywację białek wiążących penicylinę (PBP), które są niezbędnymi enzymami dla bakterii podczas syntezy ściany komórkowej. Jednakże antybiotyki te mają tylko niewielkie powinowactwo w stosunku do PBP2a, tym samym enzym ten nie ulega inaktywacji i pełni kluczową rolę podczas syntezy ściany komórek bakterii, w wyniku czego powstaje komórka zdolna do przeżycie nawet w obecności antybiotyków β-laktamowych. Właśnie z powodu obecność *mecA*, MRSA są oporne na prawie wszystkie antybiotyki β-laktamowe [26]. Gen ten jest częścią ruchomego elementu genetycznego SCC*mec*A (staphylococcal cassete chromosome *mec*A). Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające ewolucyjne pochodzenie metycylioopornych szczepów. Pierwsza z nich zakłada, iż ruchomy element genetyczny wyszedł z populacji *S. aureus* co spowodowało powstanie pojedynczego klonu MRSA, który rozprzestrzenił się na całym świecie. Natomiast druga hipoteza zakłada, że szczepy metycylinooporne ewoluowały na drodze wielokrotnego horyzontalnego transferu genu od szczepu prekursorowego MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*) [23, 86].

c) VRSA – vancomycin-resistant *S. aureus*. Zwiększona ilość zakażeń szpitalnych wywołanych szczepami MRSA wymusiła szerokie stosowanie kolejnego antybiotyku – wankomycyny. To spowodowało selekcję szczepów *S. aureus* o zredukowanej wrażliwości na lek [27], niosących kopie transpozonu Tn1546, nabytego

od opornych na wankomycynę szczepów *Enterococcus faecalis*. Transpozon posiadający oporności typu VanA, koduje dehydrogenazę (VanH), która redukuje pirogronian do D-Lac i ligazę VanA, która katalizuje tworzenie wiązania estrowego pomiędzy D-Ala i D-Lac. W wyniku czego depsypeptyd D-Ala-D-Lac zastępuje dipeptyd D-Ala-D-Ala w syntezie peptydoglikanu, znacznie zmniejszając powinowactwo dla wankomycyny i innego antybiotyku glikopeptydowego teikoplaniny [20].

6. Podsumowanie

Zagrożenie jakie niesie obecność w środowisku szczepów lekoopornych bakterii spowodowało, że coraz częściej badane są nie tylko placówki ochrony zdrowia pod kątem obecność bakterii *E. coli* oraz *S. aureus* niosących geny lekooporności na część antybiotyków stosowanych podczas leczenia zakażeń, ale również miejsca, które nie są naturalnym miejscem bytowania tych drobnoustrojów, a co więcej ich obecność jest wysoce niepokojąca. *E. coli* jest głównym mikroorganizmem odpowiedzialnym za infekcje układu pokarmowego, natomiast *S. aureus* wywołuje różne poważne i trudne w leczeniu zakażenia. Bakterie te mogą być łatwo przenoszone z osoby na osobę przez kontakt bezpośredni czy przez zanieczyszczone (fekaliami) żywność, wodę jak również glebę i piasek. Co więcej mikroorganizmy te zdolne są do produkcji entero- oraz egzotoksyn, odpowiedzialnych za 1,7–2,5 mln zgonów głównie wśród niemowląt oraz małych dzieci [29]. Dlatego monitoring środowiska pod kątem obecności tych bakterii jest bardzo istotny.

Piśmiennictwo

1. Adler A., Katz D. E., Marchaim D.: The continuing plague of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* infections. *Infect. Dis. Clin. North Am*. **30**, 347–375 (2016)
2. Ambler R.: The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**, 321–331 (1980)
3. Andriole V.: Quinolones: Past, Present and Future. *Clin. Infect. Dis*. **41**,113–115 (2005)
4. Badura A., Luxner J., Feierl G., Reinthaler F., Zarfel G., Galler H., Pregartner G., Riedl R., Grisold A:. Prevalence, antibiotic resistance patterns and molecular characterization of *Escherichia coli* from Austrian sandpits. *Environm. Pol.* **194**, 24–30 (2014)
5. Baldy-Chudzik K., Bok E., Mazurek J.: Znane i nowe warianty patogennych *Escherichia coli* jako konsekwencja plastycznego genomu. *Postepy Hig. Med. Dosw*. **69**, 345–361 (2015)
6. Bebrone C.: Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1686–1701 (2007)
7. Bondi J.A., Diez C.C.: Penicillin resistant *Staphylococci*. *Proc. Royal. Soc. Exper. Biol. Med*. **60**, 55–58 (1945)
8. Brown D.F., Edwards D.I., Hawkey P.M., Morrison D., Ridgway G.L., Towner K.J., Wren M.W.: Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 1000–1018 (2005)
9. Burkhardt W., Calci K., Watkins W., Rippey S.R., Chirtel S.J.: Inactivation of indicator microorganisms in estuarine waters. *Water Res.* **34**, 2207–2214 (2000)
10. Bush K., Bradford P.A.: β-Lactams and β-lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* DOI: 10.1101/cshperspect.a025247 (2016)
11. Bush K., Jacoby G.A.: Updated functional classification of β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. **54**, 969–976 (2010)
12. Bush K., Zgurskaya H.I. i wsp.: Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol*. **9**, 894–896 (2011)
13. Bush K.: Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1277**, 84–90 (2013)
14. Campbell E.A., Korzheva N., MustaevA., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A.: Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*. **104**, 901–912 (2001)
15. Chambers H.F.: The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis*. **7**,178–182 (2001)
16. Chen Ch-M., Huang M., Chen H-F., Ke S-Ch., Li Ch-R, Wang J-H., Wu L-W.: Fusidic acid resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital. *BMC Microbiol.* DOI: 10.1186/1471-2180-11-98 (2011)
17. Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M.: Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams. *Lancet*, *Infect. Dis*. **11**, 381–393 (2011)
18. Culp E.J., Waglechner N., Wang W., Fiebig-Comyn A.A., Hsu Y.-P., Koteva K., Sychantha D., Coombes B.K., Van Nieuwenhze M.S., Brun Y.V., Wang W. Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling. *Nature*, **578**, 582–587 (2020).
19. da Costa P.M., Loureiro L., Matos A.J.: Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **10**, 278–294 (2013)
20. Depardieu F., Podglajen I., Leclercq R., Collaz E., Courvalin P.: Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**,79–114 (2007)
21. Eady E., Cove J. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus-an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections, *Curr. Opin. Infect. Dis*. **16**, 103–24 (2003)
22. El-Hajj Z.W., Newman E.B.: An *Escherichia coli* mutant that makes exceptionally long cells. *J. Bacteriol*. **197**, 1507–1514 (2015)
23. Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Sprat B.G.: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7687–7692 (2002)
24. Erickson M.C., Habteselassie M.Y., Liao J., Webb C.C., Mantripragada V., Davey L., Doyle M.P.: Examination off actors for use as potential predictors of human enteric pathogen survival in soil. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 335–349 (2014)
25. Escherich T.: Die Darmbakterien des Neugeboren und Säuglings. *Fortschr. Med*. **3**, 515–522, 547–557 (1885)
26. Fuda C., Suvorov M., Vakulenko S.B., Mobashery S.: The basis for resistance to β-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 40802–40806 (2004)
27. Gardete S., Tomasz A.: Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **124**, 2836–2840 (2014)

29. Gaurav K., Karmakar S., Kundu K., Kundu S.: Design, development and synthesis of novel cephalosporin group of antibiotics [W]: Antibiotic resistant bacteria – a continuous challenge in the new millennium. red. M. Pana, *IntechOpen*, 2012, s. 487–502
29. Girard M., Steele D., Chaignat C.-L., Kieny M.P.: A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*, **24**, 2732–2750 (2006)
30. Gnanamani A., Hariharan P., Satyaseela M.: *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach [W:] Frontiers in *Staphylococcus aureus*. *IntechOpen*, 2017, s. 3–16
31. Gotkowska-Pachta A., Korzeniowska E.: Microbial evaluation of sandboxes located in urban areas. *Ecotox. and Environ*. **113**, 64–71 (2015)
32. Greenwood D., O'Grady F.: Scanning electron microscopy of *Staphylococcus aureus* exposed to some common anti-staphylococcal agents. *J. Gen. Microbiol*. **70**, 263–270 (1972)
33. Hartman A., Tomasz B: History of antibiotics and suphonamides discoveries. *Pol. Merkur. Lek*. **30**, 320–322 (2011)
34. Jasiewicz J., Baran A., Antoniewicz J.: Assessment of chemical composition and sanitary state of sand in selected sandboxes in Krakow. *J. Elementol.* **14**, 79–90 (2009)
35. Jevons M.: Celbenin-resistant staphylococci. *Br. Med. J*. **1**, 124–125 (1961)
36. Kim K.S.: Human meningitis-associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2015 (2016)
37. Kim Y., Qureshi Z., Adams-Haduch J.: Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. *Clin. Infect. Dis*. **55**, 224–231 (2012)
38. Kirby W.M.: Extraction of highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. *Science* **99**, 452–453 (1942)
39. Kirk M., Pires S., Black R., Caipo M., Crump J., Devleesschauwer B.: World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases. *PLoS Med*. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001921 (2015)
40. Köhler C, Dobrindt U.: What deines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 642–647 (2011)
41. Korzybski D., Nowiński A.: Makrolidy – nie tylko działanie przeciwbakteryjne. *Forum Med. Rodz.* **7**, 271–276 (2013)
42. Kozińska A., Sitkiewicz I.: Nowe i stare antybiotyki – mechanizmy działania i strategie poszukiwania leków przeciwbakteryjnych. *Kos. Prob. N. Biol*. **314**, 109–124 (2017)
43. Lee S.Y., Kotapati S., Kuti J.L., Nightingale C.H., Nicolau D.P.: Impact of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **27**, 1226–1232 (2006)
44. Licitra G.: Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg Infect Dis*. **19**, 1553 (2013)
45. Ling L., Lewis K. i wsp.: A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature,* **517**, 455–459 (2015)
46. Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., Data V., Hofman H.M., Bastian J.F., Fierer J., Nizet V..: *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*. **202**, 209–215 (2005)
47. Liu Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L. X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Ding B., Huang X.: Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet. Infect. Dis*. **16**, 161–168 (2016)
48. Lofmark S., Edlund C., Nord C. E.: Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin. Infect. Dis*. **50**, 16–23 (2010)
49. Lowy F.D.: Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest*. **111**, 1265–1273 (2003)
50. Lu Y., Sasakia T., Kuwahara-Arai K., Ueharaa Y., Hiramatsua K.: Development of a New Application for Comprehensive Viability Analysis Based on Microbiome Analysis by Next-Generation Sequencing: Insights into Staphylococcal Carriage in Human Nasal Cavities. *Appl. Environ. Microbiol*. **84**, 517–518 (2018)
51. Markiewicz Z, Kwiatkowski Z.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. *PWN*, Warszawa; 2019
52. Maslikowska J.A., Walker S.A., Elligsen M., Mitman N., Palmay L., Daneman N., Simor A.: Impact of infection with extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* species on outcome and hospitalization costs. *J. Hosp. Infect*. **92**, 33–41 (2016)
53. Mazur E. Występowanie lekoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* w miejscach użyteczności publicznej jako potencjalny czynnik zagrożenia zdrowia. *Praca magisterska. Uniwersytet Rolniczy w Krakowie* (2018)
54. Matzov D., Yonath A. i wsp.: Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*, *Nucleic Acids. Research.* **45**, 10284–10286 (2017)
55. Mendelson M., Balasegaram M., Jinks T., Pulcini C., Sharland M.: Antibiotic resistance has a language problem. *Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature* https://www.nature.com/news/antibiotic-resistance-has-a-language-problem-1.21915 (20.05.2020)
56. Miller L., Diep B.: Colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clin. Infect. Dis*. **46**, 452–460 (2008)
57. Muñiz C.C., Zelaya T.E., Esquivel G.R., Fernández F.J.: Penicillin and cephalosporin production: a historical perspective. *Rev Latinoam Microbiol.* **49**, 88–98 (2007)
58. Neidhardt F, Ingraham J., Schaechter M.: Physiology of the Bacterial Cell: A molecular approach, *Sinauer Associates*, Chicago 1990
59. Nwachuku N., Gerba Ch.: Microbial risk assessment: don't forget the children. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 206–209 (2004)
60. O'Neill J.: The Review on Antimicrobial Resistance Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations (HM Government/Wellcome Trust, 2016); Protokół dostępu http://go.nature. com/2oj9uan (20.05.2020)
61. Ochman H., Wilson A.C.: Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Molec. Evol*. **26**, 74–86 (1987)
62. Ochocki Z., Stańczak A.: Antybiotyki aminoglikozydowe. *Farm. Pol.* **61**, 707–718 (2005)
63. Oshiro R., Fujioka R.: Sand, soil and pigeon droppings: sources of indicator bacteria in the waters of Hanaumabay Oahu, Hawaii. *Water Sci. Technol*. **31**, 251–254 (1995)
64. Overgaauw P.A.M., van Knapen F.: Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet. Parasitol.* **193**, 398–403 (2013)
65. Pantel L., Gualtieri M. i wsp.: Odilorhabdins, Antibacterial Agents that Cause Miscoding by Binding at a New Ribosomal Site. *Mol Cell*. **70**, 83–94 (2018)
66. Pappelbaum K., Kasprzak J., Czaczyk K.: Występowanie werotoksycznych *Escherichia coli* w żywności, ze szczególnym uwzględnieniem serotypu O104:H4. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* **5**, 33–48 (2015)
67. Patel G., Bonomo R.A.: Stormy waters ahead: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2013.00048 (2013)
68. Perry J., Waglechner N, Wright G.: The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. **6**, DOI:10.1101/cshperspect.a025197 (2016)

69. PN-EN 1176-1:07.2009 Wyposażenie placów zabaw i nawierzchnie. Część 1: Ogólne wymagania bezpieczeństwa i metody badań
70. Rammelkamp C.H., Maxon T.: Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Exp. Biol. Med*. **51**, 386–389 (1942)
71. Rasheed J.K., Kitchel B., Zhu W., Anderson K.F., Clark N.C., Ferraro M.J., Savard P., Humphries R.M., Kallen A.J., Limbago B.M.: New Delhi metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, *United States. Emerg. Infect. Dis*. **19**, 870–878 (2013)
72. Reygaert W.C.: Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*. [W]: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, red. A. Méndez-Vilas, *Formatex Research Center*, Hiszpania, 2013, s. 297–305
73. Schroeder E.K., De Souza N., Santos D.S., Blanchard J.S., Basso L.A.: Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Pharm. Biotechnol*. **3**, 197–225 (2002)
74. Schultsz C., Geerlings S.: Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*. *Drugs*. **72**, 1–16 (2012)
75. Shah A.H., Fleming L.E. i wsp.: Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminths in sand at a subtropical recreational beach site. *J. Appl. Microbiol*. **110**, 1571–1583 (2011)
76. Supuran C.: Special Issue: Sulfonamides, *Molecules*, **22**, 1642 (2017)
77. Taylor S.D., Palmer M.: The action mechanism of daptomycin. *Bioorg. Med. Chem*. **24**, 6253–6268 (2016)
78. Thomson K.S.: Extended-spectrum-β-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol*. **48**, 1019–1025 (2010)
79. Touhami A, Jericho MH, Beveridge TJ.: Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. **186**, 3286–3295 (2004)
80. Tupina A.,Gualtieri M., Roquet-Bančresa F., Morichauda Z., Brodolina K., Leonettia J-P.: Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int*. *J. Antimicrob. Agents*, **35**, 519–523 (2010)
81. UN News Centre.: UN announces interagency group to coordinate global fight against antimicrobial resistance, http://go.nature.com/2pcqx28 (20.05.2020)
82. Van Bambeke F., Michot J.M., Van Eldere J., Tulkens P.M.: Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect*. **11**, 256–280 (2005)
83. van de Sande-Bruinsma N., Grundmann H., Verloo D., Tiemersma E., Monen, J., Goossens H., Ferech M.: European antimicrobial resistance surveillance system group, European surveillance of antimicrobial consumption project group. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis*. **14**, 1722–1730 (2008)
84. Wellcome Trust: Exploring the Consumer Perspective on Antimicrobial Resistance (Wellcome Trust, 2015), http:// go.nature.com/2pkwcbw (20.05.2020)
85. WHO: World Health Organization Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey, http://go.nature. com/2ptdypm (20.05.2020)
86. Wielders C., Fluit A.C., Brisse S., Verhoef J., Schmiz F.J.: *mec*A Gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol*. **40**, 3970–3975 (2002)
87. Yang Y.S., Ku C.H., Lin J.C., Shang ST., Chiu C.H., Yeh K.M., Lin C.C., Chang F.Y.: Impact of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* on the outcome of community-onset bacteremic urinary tract infections. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. **43**, 194–199 (2010)
88. Yigit H., Queenan A., Anderson G.: Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **45**, 1151–1161 (2001)
89. Zalecenia Głównego Inspektora Sanitarnego z dnia 05.05.2009 r. GIS-BI-074-68-1/J0/09, http://www.pssedg.eu/ ww_piaskownica.php (20.05.2020)
90. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa. Teoria i ćwiczenia. Red. I. Zmysłowska, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego, Olsztyn, 2009, s. 195

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 91–102
DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.08

ORTHOHANTAVIRUS SPP. – PRZEGLĄD RODZAJU

Kamil Leis[1], Patryk Kaczor[1], Aleksandra Baska[1], Jakub Kazik[1], Michalina Kolan[1], Katarzyna Grudlewska-Buda[2], Natalia Wiktorczyk[2], Krzysztof Skowron[2]*

[1] Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 85-067 Bydgoszcz, Polska
[2] Katedra Mikrobiologii, Wydziała Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 85-067 Bydgoszcz, Polska

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w grudniu 2020 r.

Streszczenie: Orthohantawirusy i powodowane przez nie infekcje znane były już w średniowieczu jako tzw. „angielskie poty". Istnieją dwa główne schorzenia wywoływane przez te wirusy – HPS (hantawirusowy zespół płucny) i HFRS (gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym). Główny rezerwuar tych drobnoustrojów stanowią gryzonie, a człowiek zaraża się nimi najczęściej drogą wziewną, w wyniku kontaktu z wydzielinami i odchodami nosicieli. HPS charakteryzuje się nagłym początkiem, a do objawów zaliczają się przede wszystkim kaszel, gorączka i trudności z oddychaniem, a w skrajnych przypadkach – niewydolność oddechowa i wstrząs kardiogenny. HFRS rozpoczyna się nagle, a główna manifestacja obejmuje gorączkę, niewydolność nerek, krwotoki, krwiomocz i białkomocz, a także wstrząs. Na ten moment, terapia antyhantawirusowa o udowodnionej skuteczności nie istnieje. Kluczową rolę w leczeniu stanowią oszczędny tryb życia, kontrola gospodarki elektrolitowej, płynoterapia oraz zapobieganie niedociśnieniu, a w wymagających tego przypadkach – podanie tlenu. Odchylenia od wartości prawidłowych w analizach laboratoryjnych osób zainfekowanych tym patogenem zależą od zajętego przez proces chorobowy organu.

1. Historia 2. Systematyka rodzaju Orthohantavirus spp. 3. Morfologia 3.1. Genom 3.2. Budowa wirionu 4. Mechanizm infekcji 4.1. Droga zarażenia 4.2. Cykl życiowy 5. Chorobotwórczość 6. Leczenie 7. Diagnostyka 8. Profilaktyka – szczepionki 9. Podsumowanie

ORTHOHANTAVIRUS SPP. – REVIEW OF GENUS

Abstract: The infections caused by orthohantaviruses were already known in the Middle Ages as "English sweats." There are two main diseases caused by these viruses – HPS (hantavirus pulmonary syndrome) and HFRS (hemorrhagic fever with renal syndrome). Rodents are the main reservoir of these microorganisms, and humans usually catch them by inhalation, as a result of contact with secretions and droppings of carriers. HPS is characterized by a sudden onset, and symptoms include primarily cough, fever and difficulty breathing, and in extreme cases – respiratory failure and cardiogenic shock. HFRS begins suddenly and the main manifestation includes fever, renal failure, hemorrhage, hematuria and proteinuria, as well as shock. At present, anti-hantavirus therapy with proven effectiveness does not exist. A key role in the treatment is resting lifestyle, electrolyte control, fluid therapy and prevention of hypotension, and in harder cases – administration of oxygen. Deviations from normal values in laboratory analyzes of people infected with this pathogen depend on the organ affected by the disease process

1. History 2. Systematics of Orthohantavirus spp. genus 3. Morphology 3.1. Genome 3.2. Structure of the virion 4. Mechanism of infection 4.1. Route of infection 4.2. Life cycle 5. Pathogenicity 6. Treatment 7. Diagnostics 8. Prevention – vaccines 9. Summary

Słowa kluczowe: gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym, hantawirusowy zespół płucny, HFRS, HPS, orthohantawirus
Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome, hantavirus pulmonary syndrome, HFRS, HPS, orthohantavirus

1. Historia

Infekcje orthohantawirusami znane były już od średniowiecza. Jedno z pierwszych udokumentowanych zakażeń miało miejsce w 1485 roku w Anglii. Nagły atak wirusowej choroby zakaźnej określono wówczas jako angielskie poty lub „sudor anglicus". Zgodnie z dostępnymi danymi historycznymi, ta wówczas tajemnicza choroba dotykała ludzi majętnych. W latach 1508, 1517, 1528 i 1551 miały miejsce kolejne cztery epidemie infekcji hantawirusowych. Różnice w czasie między powstawaniem ognisk choroby mogą wskazywać na szeroko rozpowszechnione wrota zakażenia. Choroba charakteryzowała się gwałtownym początkiem, skorelowanym z porą dnia (najczęściej do początku manifestacji objawów dochodziło w nocy lub rano). Występowały dreszcze, gorączka, wysypka oraz uczucie osłabienia. Po kilku godzinach od pierwszych objawów

* Autor korespondencyjny: dr hab. inż. Krzysztof Skowron, prof. UMK, Katedra Mikrobiologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-067 Bydgoszcz, Polska; tel. 512-210-245; e-mail: skowron238@wp.pl

mogło dojść do zgonu pacjenta. Ogólna śmiertelność, według danych, waha się w granicach 5–90%, jednak większość źródeł podaje statystykę 30–50%. Po dobie „pocenia się" pacjent wracał do zdrowia [6, 23, 59].

Kolejną chorobą o etiologii hantawirusowej, znaną z zapisków historycznych, były „poty Pikardii", występujące głównie na terenie Francji, ale także w Niemczech lub Włoszech w latach 1718–1861. Do objawów należały gorączka oraz poty, jednak w porównaniu do „angielskich potów", „poty Pikardii" cechowały się dużo wyższym odsetkiem przeżywalności i dotyczyły głównie ubogiej ludności wiejskiej. Uważa się, że była ona powodem śmierci kompozytora Wolfganga Amadeusza Mozarta [6, 23].

Uważa się, że występujące podczas I wojny światowej okopowe zapalenie nerek ma najprawdopodobniej etiologię orthohantawirusową, podobnie jak występująca w czasie II wojny światowej choroba przebiegająca podobnie do zakażenia bakteriami z rodzaju *Leptospira* [9].

W latach 1951–1953, w czasie wojny w Korei, około 3000 żołnierzy uległo zakażeniu hantawirusami, które objawiało się w postaci manifestacji nerkowej ze wstrząsem i krwotokami. Śmiertelność wynosiła około 10%. Dopiero w 1976 roku wyjaśniono etiologię zachorowań z czasów wojny koreańskiej. Z materiału pobranego od myszy wyizolowano wirus *Haantan* [9].

W 1993 roku w Stanach Zjednoczonych miała miejsce epidemia nazwana „Four Corners". Czynnikiem etiologicznym był wówczas nowo odkryty wirus *Sin Nombre*, wyizolowany z materiału pobranego od myszy *Peromyscus maniculatus*. Powodował on zespół płucny o bardzo ciężkim przebiegu, jego śmiertelność wynosiła około 50%, a powodował go kontakt z odchodami gryzoni. Od kwietnia 1993 do maja 1993 CDC (ang. Centers for Disease Control and Prevention) doniosło o 24 przypadkach śmiertelnych [9, 10].

2. Systematyka rodzaju Orthohantavirus spp.

Wirusy z rodzaju *Orthohantavirus* spp. należą do podrodziny *Mammantavirinae*, do rodziny *Hantaviridae* oraz do rzędu *Bunyavirales* [1, 26].

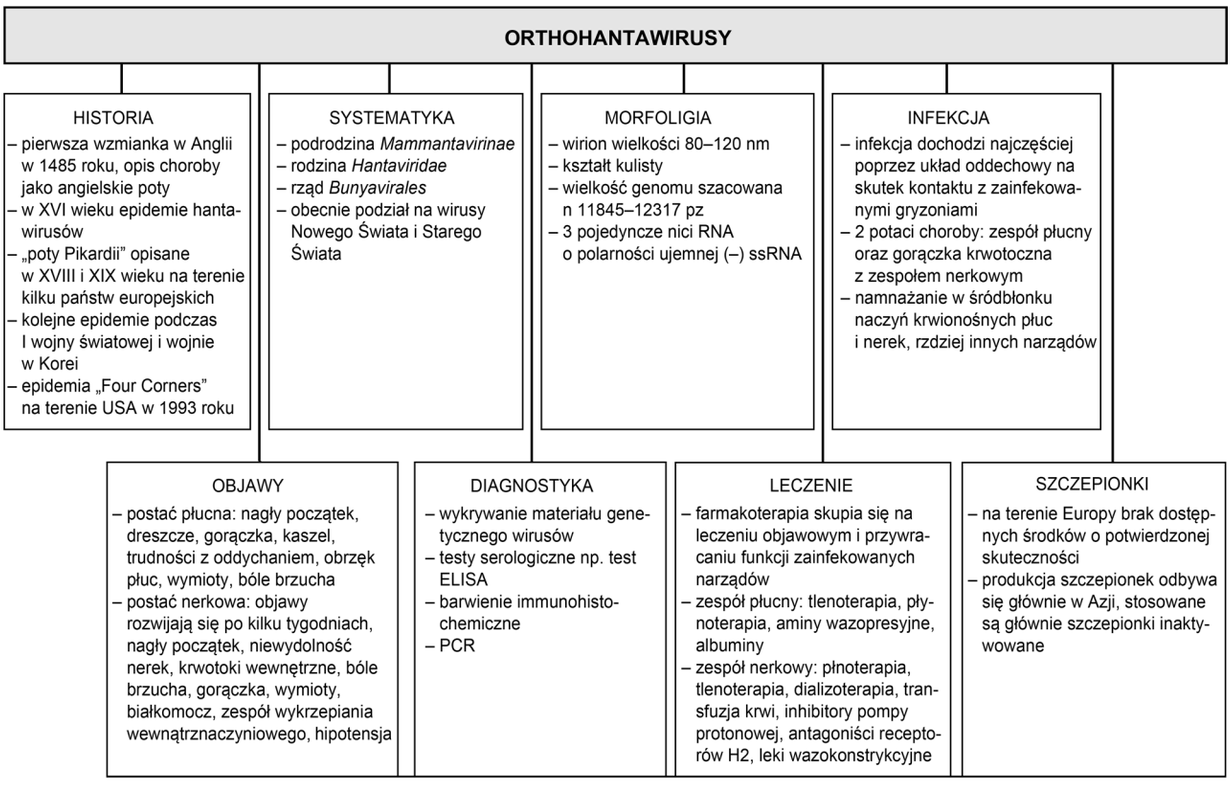
Niektóre orthohantawirusy zakwalifikowane zostały dodatkowo do 3 głównych drzew filogenetycznych, w zależności od ich segmentów S. Podział ten stanowi przykład ko-ewolucji wirus–gospodarz, gdyż pokrywa się on z przenosicielami tych wirusów oraz interakcjami wirus–komórka i powodowanymi głównymi zespołami chorobowymi związanymi z infekcją orthohantawirusami [28, 41, 44, 48, 60].

Zestawienie wybranych przedstawicieli dotychczas zidentyfikowanych gatunków tego rodzaju oraz znanych gospodarzy i powodowane przez nie choroby, a także podział na wirusy Nowego i Starego Świata oraz główne ich lokalizacje przedstawiono w tabeli I. Z kolei przegląd najważniejszych informacji dotyczących omawianych wirusów przedstawiono na rycinie 1.

Tabela I
Zestawienie wybranych przedstawicieli rodzaju *Orthohantavirus*

Gatunek	Skrót	Nosiciel*	Choroba**	Główna lokalizacja
Stary świat (Old world)				
Dobrava-Belgrade orthohantavirus	DOBV	Muridae	HFRS	Słowenia, Bałkany
Hantaan orthohantavirus	HTNV	Muridae	HFRS	Korea Południowa, Chiny
Seoul orthohantavirus	SEOV	Muridae	HFRS	cały świat
Khabarovsk orthohantavirus	KBR	Arvicolinae	nieznana	wschodnia Rosja
Prospect Hill orthohantavirus	PHV	Arvicolinae	nieznana	Maryland (USA)
Puumala orthohantavirus	PUUV	Arvicolinae	HFRS/NE	Finlandia, Europa i Azja
Tula orthohantavirus	TULV	Arvicolinae	HFRS	Rosja, Europa
Nowy świat (New world)				
Andes orthohantavirus	ANDV	Cricetidae	HPS	Argentyna, Chile
Bayou orthohantavirus	BAYV	Cricetidae	HPS	Luizjana (USA)
Black Creek Canal orthohantavirus	BCCV	Cricetidae	HPS	Floryda (USA)
Cano Delgadito orthohantavirus	CADV	Cricetidae	nieznana	Wenezuela
Choclo orthohantavirus	CHOV	Cricetidae	HPS	Panama
El Moro Canyon orthohantavirus	ELMC	Cricetidae	nieznana	Kalifornia (USA)
Laguna Negra orthohantavirus	LNV	Cricetidae	HPS	Paragwaj, Boliwia, Argentyna
Sin Nombre orthohantavirus	SNV	Cricetidae	HPS	Nowy Meksyk (USA)

* Muridae – myszowate; Arvicolinae – nornikowate; Cricetidae – chomikowate
** HFRS – gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym; HPS – hantawirusowy zespół płucny; NE – nefropatia epidemiczna [1, 26, 28, 41, 44, 48, 60].



Ryc. 1. Najważniejsze informacje dotyczące hantawirusów

3. Morfologia

3.1. Genom

Wirusowy genom osiąga wielkość 11845–12317 pz, składa się z 3 pojedynczych, nici RNA o polarności ujemnej (–) ssRNA i określany jest w piśmiennictwie jako trójdzielny. Wyróżnia się w nim 3 fragmenty: duży – L (ang. large), kodujący białko L, średni – M (ang. medium), kodujący prekursor dla glikoprotein Gn i Gc oraz mały – S (ang. small), kodujący białko nukleokapsydowe. Te zaś są podzielone na region 3'- niekodujący, region 5' oraz region kodujący. Białko L spełnia funkcję polimerazy RNA, endonukleazy, replikazy i transkryptazy. Fragment długi i średni wykazują stałość, natomiast fragment krótki różni się długością u poszczególnych gatunków. Ich produkty charakteryzują się podobną długością u poszczególnych gatunków hantawirusów. Cały zaś genom wykazuje około 60–70% zgodności międzygatunkowej [18, 19, 28, 42, 47].

Rybonukleoproteiny to pojedyncze segmenty RNA połączone z białkiem N, które z racji braku białek macierzy przejmują ich funkcje a także odpowiadają za nitkowaty wygląd wirionów hantawirusowych [19, 28, 47].

Jak każdy *Bunyavirus*, genom przybiera okrągły kształt, powstały na skutek łączenia końców 3' i 5', które charakteryzują się komplementarnością, co pozwala im tworzyć struktury typu „paletki" (ang. *panhandle structures)* o zaburzonej komplementarności i wielkości 17 pz, z czego 14 pz wykazuje swoistość dla danego gatunku. Uważa się, że uczestniczą one w procesach replikacji oraz transkrypcji. Końce 5' zakończone są sekwencją UAG, która powtarza się trzy razy. Posiadają one 10–18 nukleotydów pochodzących od gospodarza oraz czapeczkę (kap) zawierającą resztę metylową. Wirusolodzy zwracają szczególną uwagę na NCR na końcu 3' w segmencie S, który cechuje się dużą zmiennością długości, wahającej się w granicach 229–728 pz [19, 28, 47].

W niektórych gatunkach, takich jak np. *Bayou*, *Puumala* czy *Tula*, obecna jest otwarta ramka odczytu dla białka NS, kodowana przez fragmenty M i S, która koduje Gn i Gc. Struktura ta nie występuje jednak w komórkach zainfekowanych gospodarza, z wyjątkiem wirusa *Puumala*. Nie zostało jednak ustalone, dlaczego wirusy zbliżone do hantawirusów nie posiadają otwartej ramki odczytu. Białka NS nie posiadają za to wirusy *Seoul* i *Hantaan* [19, 28, 47].

3.2. Budowa wirionu

Wiriony mają zazwyczaj długość 80–120 nm, przybierają kulisty kształt, a ich kapsyd zbudowany jest z białka nukleokapsydowego N, bogatego w cysteinę i układającego się w trimery [28, 42, 54]. Występują jednak także gatunki osiągające 160 nm, a formy

pleomorficzne mogą osiągać rozmiary 78–210 nm [54, 62]. Zewnętrzna powierzchnia, podobnie jak w innych Bunyawirusach, tworzy kwadratową, siatkowatą strukturę, a jej glikoproteiny Gn i Gc, tworzące wypustki, sięgają 6 nm (według innych danych 7 nm lub 12 nm) od podwójnej otoczki lipidowej i tworzą struktury na kształt kolców [19, 28, 54, 56]. Osłonka wirionu zbudowana jest głównie z błon pochodzących z aparatu Golgiego. Oprócz aminokwasów, zawierają one 2–7% węglowodanów i 20–30% lipidów.

Wiriony wykazują gęstość na poziomie 1,16–1,25 g/cm^3, w zależności od roztworu [19, 54]. Optymalnym pH jest dla nich 5,8–9,0, a wirus pozostaje zjadliwy w temperaturze 4–42°C przez okres 1–3 dni. Masa molekularna wynosi $300–400 \times 10^6$ [54].

4. Mechanizm infekcji

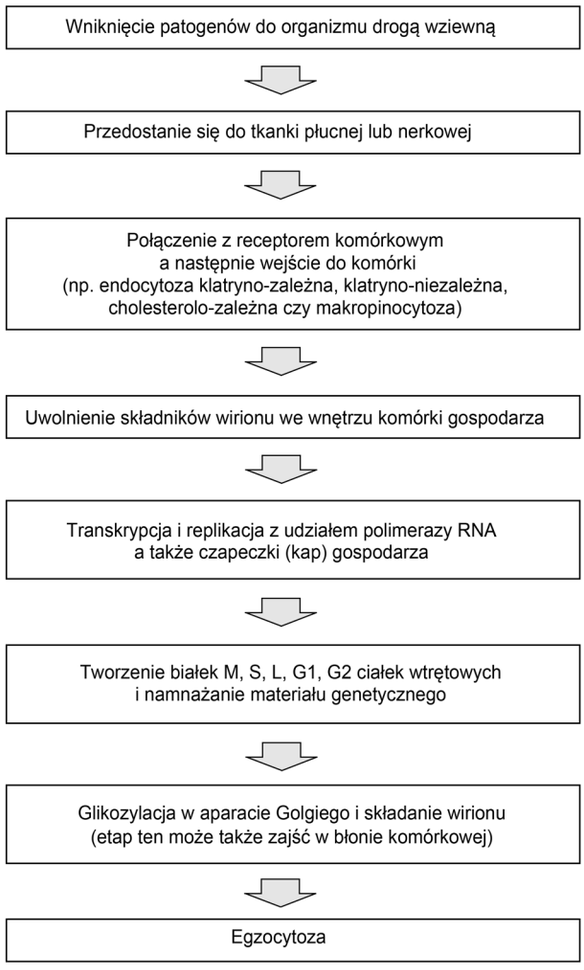
4.1. Droga zarażenia

Wirus do organizmu człowieka dostaje się najczęściej drogą wziewną wraz z odchodami i wydzielinami gryzoni [3]. Znane są także przypadki zakażenia *Andes orthohantavirus* od drugiego człowieka, natomiast *Puumala orthohantavirus* może zostać przeniesiony poprzez transfuzję składników krwi, przede wszystkim płytek krwi. Vaheri i wsp. [60] w swoim artykule przeglądowym opublikowanym w 2013 roku twierdzą, że infekcje przewlekłe związane z zakażeniem tym patogenem nie zostały do tej pory odnotowane. Wirusy z rodzaju *Orthohantaviruses* spp. prowadzą do zakażeń o ostrym przebiegu, dotyczących głównie układu hormonalnego, nerek, płuc, serca oraz OUN (ośrodkowy układ nerwowy). Wyróżnia się 2 główne obrazy kliniczne: gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS – haemorrhagic fever with renal syndrome) oraz hantawirusowy zespół płucny (HPS – hantavirus pulmonary syndrome). Oba zespoły kliniczne są prawdopodobnie tą samą chorobą o różnym obrazie klinicznym – Vaheri i wsp. [60] zalecają nazywać je chorobami hantawirusowymi. Objawy obu tych zespołów związane są z odpowiedzią komórkową swoistą i nieswoistą (wrodzoną) oraz bezpośrednim wpływem wirusa na śródbłonek [44, 60].

4.2. Cykl replikacyjny

Cykl replikacyjny hantawirusów przedstawiono na rycinie 2.

Do replikacji hantawirusów dochodzi głównie w śródbłonku naczyń krwionośnych, przede wszystkim nerek i płuc, a także w makrofagach [44, 60]. W warunkach *in vitro*, integryny stanowią główne receptory dla tych wirusów, jednak nie jest to potwierdzone *in vivo*. Kolejnym etapem po połączeniu wirusa ze swoistym receptorem komórkowym jest jego wejście do komórki. Nie istnieje jeden sposób, na który wirusy z rodzaju *Orthohantavirus* spp. dokonują tej czynności. Przykładowo, HTNV wnikają do komórki gospodarza na drodze endocytozy klatryno-zależnej, podczas której następuje pobranie wirusa w specjalnym pęcherzyku endocytarnym pokrytym klatryną. Do innych alternatywnych sposobów wnikania należą klatryno-niezależna endocytoza mediowana receptorem, makropinocytoza, endocytoza cholesterolo-zależna, endocytoza pęcherzykowo-zależna oraz prawdopodobnie inne ścieżki, które do tej pory nie zostały jeszcze poznane. Zamknięcie cząsteczki wirusa w pęcherzyku błonowym zapobiega jego degradacji przez lizosomy. Po internalizacji komórki wirusa, na skutek zmniejszonego pH we wnętrzu endosomu dochodzi do jego odłączenia od receptorów komórkowych. Następuje także zmiana konformacji glikoprotein, co umożliwia fuzję błony komórkowej i wirusa, a ostatecznie odpłaszczenie, czyli uwolnienie do cytoplazmy komórki gospodarza materiału genetycznego w postaci trzech rybonukleoprotein [14, 28, 60].



Ryc. 2. Cykl replikacyjny hantawirusów

Zarówno transkrypcja, jak i replikacja wirusów związana jest z wirusową polimerazą RNA zależną od RNA (RdRp). Hantawirusy nie są w stanie samodzielnie zsyntetyzować czapeczki (kap) na koniec 5' mRNA, dlatego przeprowadzają tzw. *cap snatching*, czyli wykorzystują czapeczki (kap) mRNA gospodarza przeznaczone do degradacji. Proces ten zachodzi w cytoplazmatycznych ciałkach P i umożliwia translację [60].

Białko N ma kluczowe znaczenie w cyklu życiowym wirusa i jest tworzone w początkowym etapie infekcji – sugeruje się, że może mieć ono wpływ na odpowiedź immunologiczną gospodarza. Przed transkrypcją dochodzi do rozszczepienia mRNA przez RdRp, co umożliwia utworzenie starterów otoczonych czapeczką (kap) [45]. Pierwotna transkrypcja prowadzi do powstania mRNA wirusowych białek S, M i L. Fragment M odpowiada za kodowanie prekursorów glikoprotein powierzchniowych G1 i G2, fragment S służy za matrycę dla białka N, natomiast fragment L koduje RdRp. Następnie na wolnych rybosomach dochodzi do translacji fragmentów kodujących mRNA białek S i L, natomiast translacja fragmentu mRNA kodującego białko M ma miejsce w retikulum endoplazmatycznym. W cytoplazmie dochodzi także do tworzenia się złożonych z wirusowych nukleoprotein ciałek wtrętowych. Ostateczna glikozylacja zachodzi w kompleksie Golgiego, do którego transportowane są powstałe glikoproteiny G1 (Gn) i G2 (Gc) [28, 44, 45].

Po replikacji wirusowego RNA dochodzi do jego składania w aparacie Golgiego lub, w przypadku wirusów Nowego Świata, do jego alternatywnego składania w błonie komórkowej. W wyniku enkapsydacji kopii wirusowego RNA przez białko N dochodzi do powstania rybonukleoprotein. Dyneina umożliwia ich transport wzdłuż mikrotubul do ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment* – przedział pośredni między aparatem Golgiego a retikulum endoplazmatycznym), gdzie dochodzi do formowania wirionów. Kolejnym etapem jest utworzenie pęcherzyka wydzielniczego zawierającego cząstkę wirusa w cysternach aparatu Golgiego, który następnie transportowany jest do błony komórkowej gospodarza, gdzie okrywany jest błoną białkowo-lipidową i uwalniany z komórki na drodze egzocytozy [28, 44, 60].

5. Chorobotwórczość

Wirusy z rodziny *Hantavirus* wywołują hantawirusowy zespół płucny (HPS – hantavirus pulmonary syndrome), określany niekiedy jako zespół sercowo-płucny (HCPS – hantavirus cardio-pulmonary syndrome), oraz gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym (HFRS – hemorrhagic fever with renal syndrome) [27]. Zakażenia związane są z kontaktem z gryzoniami, które stanowią główny rezerwuar drobnoustrojów. Nie udokumentowano transmisji z człowieka na człowieka, jednak taka droga szerzenia się infekcji jest możliwa – opisano przypadki na terenie Ameryki Południowej [27].

Pierwsze schorzenie zostało opisane w 1993 roku, podczas epidemii w Stanach Zjednoczonych, nazwanej „Four Corners", spowodowanej odkrytym przy tej okazji wirusem *Sin Nombre* [24]. Przyczyną jest infekcja takimi wirusami, jak: wirus Andów, wirus Bayou, wirus Black Creek Canal, wirus New York, wirus Monongahela oraz wymieniony wcześniej wirus Sin Nombre. Choroba występuje głównie na terenie Ameryki Północnej i Ameryki Południowej [37, 38].

Hantawirusowy zespół płucny cechuje się gwałtownym, nagłym początkiem, a objawy pojawiają się do 8 tygodni od infekcji. Zalicza się do nich: gorączkę, kaszel, dreszcze, uczucie zmęczenia, nudności i wymioty, ból i zawroty głowy, osłabienie apetytu, bóle stawowo-mięśniowe, sztywność mięśni, ból brzucha, biegunki, trudności z oddychaniem, tachypnoe (ang. *tachypnea* – przemijający, szybki oddech), uczucie ucisku na klatce piersiowej, obrzęk płuc, tachykardię, hipotensję oraz powiększenie śledziony. Objawy te dotyczą około 50% chorych. W skrajnych przypadkach może dojść do zaawansowanej duszności, niewydolności oddechowej oraz wstrząsu kardiogennego. Wyróżnia się dwie fazy choroby: wczesną, gdzie dominują objawy niespecyficzne, a także późną, która rozwija się do 10. dnia po rozwinięciu się fazy wczesnej (występują tutaj: kaszel, obrzęk płuc, uczucie ucisku na klatkę piersiową oraz duszności). Śmiertelność szacuje się na poziomie 38–40% [20, 27, 37].

Do możliwych manifestacji HPS zalicza się również zapalenie mięśnia sercowego. Saggioro i wsp. [50] w 2007 roku porównali mięśnie sercowe osób zmarłych na hantawirusowy zespół płucny z sercami osób, których zgony nastąpiły z innych przyczyn. Badacze ci stwierdzili, że w tkance mięśniowej pobranej od osób z HPS występuje antygen hantawirusowy, a także wyższe stężenia makrofagów, TNF- α, TNF-γ, limfocytów Th1, limfocytów Th2 i limfocytów B. Zaobserwowano również obszary martwicy miocytów [50].

Uważa się, że podczas rozwoju HPS limfocyty T CD8+ działają na endoteliocyty, w wyniku czego dochodzi do uszkodzenia śródbłonka, aktywacji limfocytów oraz przecieku naczyniowego [37, 49, 58]. Po wniknięciu patogenów, na skutek replikacji, dochodzi do zaburzenia integralności śródbłonka. Zachodzi połączenie pomiędzy hantawirusami a receptorami β3-integryn, co wiąże się ze wzrostem przepuszczalności ścian naczyń. Wpływa na to również blokowanie przez te drobnoustroje aktywacji trombocytów (powstaje poinfekcyjna trombocytopenia, która jest również wynikiem napływu trombocytów do zajętego przez hantawirusy śródbłonka). Innym czynnikiem

zmienionej przepuszczalności jest wzrost stężeń VEGF (vascular endothelial growth factor – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego) poprzez niedotlenienie i jego łączenie z receptorem R2 oraz zmniejszenie stężeń VE-kadheryn, co skutkuje niszczeniem wiązań przylegających w śródbłonku [21, 37].

Borges i wsp. [5], analizując 21 przypadków HPS doszli do wniosku, że w odpowiedzi immunologicznej bierze udział interleukina-6, limfocyty Th1 (wzrost stężenia odpowiedni do zaawansowania choroby) oraz limfocyty Th2 (odpowiedź zarówno komórkowa, jak i humoralna). Spada natomiast stężenie TGF-β [5]. Potwierdzono również obecność interferonu gamma, interleukiny-1 i TNF-alfa [37].

Diagnostyka hantawirusowego zespołu płucnego może sprawiać trudności, ze względu na rzadkość występowania oraz początkowe niespecyficzne, grypopodobne objawy. Kluczowym elementem jest wywiad, ukierunkowany na ekspozycję na gryzonie. Informacja ta, w połączeniu ze skróconym, spłyconym oddechem i gorączką może świadczyć o infekcji hantawirusami [27]. W badaniach laboratoryjnych natomiast obserwuje się małopłytkowość, leukocytozę czy podwyższony hematokryt i kreatyninę. Charakterystyczną cechą jest również obecność specyficznych immunoglobulin M oraz wzrost miana specyficznych przeciwciał w klasie IgG. Za pomocą PCR (polimerase chain reaction) można wykryć też materiał genetyczny wirusa [37, 38].

MacNeil i wsp. [38] w 2011 roku opublikowali wyniki analiz przypadków hantawirusowego zespołu płucnego z lat 1993–2009, obejmujących 510 pacjentów. Na terenie Stanów Zjednoczonych dochodziło co roku do 11–48 infekcji. Średni wiek chorych wynosił 38 lat, przedział wiekowy większości zachorowań mieścił się natomiast w granicach 20–50 lat. Wśród zachorowań, 78% dotyczyło rasy kaukaskiej, 64% obejmowało mężczyzn, a 7% stanowiły dzieci. Zgony wystąpiły w 35% przypadków HPS. Czas od pierwszej manifestacji infekcji do śmierci pacjenta wynosił średnio 6 dni. Chorzy w badaniach obrazowych mieli uwidocznione cechy ARDS (ang. *acute respiratory distress syndrome*), występowały również nacieki płucne [38].

Gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym stanowi natomiast kilka chorób podobnych do siebie pod względem klinicznym oraz etiologicznym. Wywołują ją takie patogeny, jak: wirus Dobrava, wirus Hantaan, wirus Saaremaa, wirus Seoul oraz wirus Puumala. Choroba występuje na całym świecie (Hantaan jest obecny w Azji; Dobrava, Saaremaa i Puumala w Europie; natomiast Seoul stanowi gatunek kosmopolityczny) [27].

Pierwsze objawy choroby pojawiają się do 2 tygodni od infekcji, choć mogą być też niezauważalne przez pierwsze 8 tygodni. HFRS charakteryzuje się nagłym początkiem i występowaniem m.in. bólów głowy, brzucha i pleców, gorączki, nudności, wymiotów, zaburzeniami widzenia oraz obecnością stanu zapalnego w obrębie oka. W zaawansowanej fazie choroby pojawiają się hipotensja, niewydolność nerek, krwotoki, przecieki naczyniowe, nadmiar płynów w organizmie, krwiomocz, białkomocz, DIC (ang. *disseminated intravascular coagulation* – zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego), a także wstrząs. Za triadę charakterystycznych dla HFRS objawów uważa się: gorączkę, niewydolność nerek i krwawienia. Wyróżnia się 5 faz przebiegu choroby:

1) faza gorączkowa – faza ta charakteryzuje się nagłym początkiem, występuje gorączka, leukocytoza, dreszcze, bóle głowy i pleców. Za wzrost temperatury oraz wzrost stężenia krwinek białych odpowiada interleukina-1, TNF-α oraz interferon-γ.
2) faza hipotensji – w fazie tej pojawia się trombocytopenia, tachykardia, hipotensja, zaczerwienienie skóry i niedotlenienie. W wyniku infekcji patogenami następują zaburzenia przepuszczalności śródbłonka, rozszerzenie naczyń oraz gromadzenie się płynu w przestrzeni pozaotrzewnowej, osierdziu, czy opłucnej. W ciężkich postaciach może dojść do wstrząsu.
3) faza skąpomoczu – pojawia się niewydolność nerek (w niektórych przypadkach nieodwracalna) z białkomoczem. Następuje spadek filtracji kłębuszkowej i wzrost stężeń kreatyniny oraz mocznika, rozwija się również azotemia. Hipotensja pogłębia objawy niewydolności, dochodzi też do obrzęku nerek i uszkodzenia cewek nerkowych.
4) faza wielomoczu – ilość moczu oddawanego przez pacjentów może wynosić nawet do 6 litrów na dobę. W fazie tej, podobnie jak w fazie poprzedniej, może dojść do krwawień z naczyń zaopatrujących płuca, a także do obrzęku płuc, spowodowanego wzrostem przepuszczalności śródbłonka, czego skutkiem może być rozwinięcie wstrząsu. W wyniku wzrostu oporu naczyniowego oraz odwrócenia przecieku rozwija się także nadciśnienie tętnicze. Zazwyczaj wielomocz świadczy o początkach procesów rekonwalescencji zachodzących w nerce.
5) faza zdrowienia – następuje powrót do zdrowia. Trwa on od kilku tygodni do kilku miesięcy.

Śmiertelność zależy od gatunku wirusa, który spowodował HFRS. Wirus Hantaan powoduje śmierć około 5–15% pacjentów, natomiast infekcja wirusem Puumala kończy się zgonem w mniej niż 1% wszystkich przypadków [17, 27, 31, 36]. Metodami diagnostycznymi są m.in. testy serologiczne (np. testy immunofluorescencyjne czy ELISA), barwienie immunohistochemiczne oraz wykrywanie wirusowego materiału genetycznego [27, 31, 46].

Golovljova i wsp. [22] przedstawili w 2007 roku wyniki analiz dotyczących gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym na terenie Estonii. Badali oni suro-

wicę ponad 300 pacjentów podejrzanych o HFRS. U 25 chorych określono etiologię: u 21 odpowiedzialny za chorobę był wirus Puumala, u 3 wirus Saaremaa, a u 1 – wirus Dobrava. Infekcja najczęściej manifestowała się bólem pleców, zaburzeniem funkcji nerek i podwyższeniem temperatury ciała. Często występował również skąpomocz z następującym po nim wielomoczem (częstość objawów zależna była od czynnika etiologicznego). Do rzadziej występujących objawów należały dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, krwotoki, a także zaburzenia widzenia, choć autorzy wspominają, iż te ostatnie w innym badaniu występowały aż w 83%. Zakażenia wirusem Puumala oraz wirusem Saaremaa powodowały trombocytopenię odpowiednio w ponad 57% i 33% przypadków, natomiast wszystkie infekcje tymi wirusami skutkowały wzrostem stężeń kreatyniny. Nieprawidłowości te nie wystąpiły jednak u pacjenta, u którego choroba spowodowana była przez wirusa Dobrava [22].

W 2007 roku w Szwecji doszło do wybuchu HFRS, spowodowanej wirusem Puumala. Doszło wówczas do infekcji oraz następczej nefropatii 313 osób na każde 100 000. Dominowała łagodna postać choroby. Jedynie około 30% wszystkich przypadków wymagało hospitalizacji, a 2 przypadki zakończyły się zgonem. Inną epidemią była ta z 2017 roku, obejmująca Kanadę oraz Stany Zjednoczone. Czynnikiem etiologicznym był wówczas wirus Seoulu, a infekcje wykryto u 17 osób i 31 gryzoni [27, 46].

Anderson i wsp. [2] donieśli w 2016 roku o przypadku wystąpienia neuropatii z charakterystycznym bólem neuropatycznym powstałej na skutek infekcji orthohantawirusem [2].

6. Leczenie

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy medycznej, nie istnieje terapia przeciwhantawirusowa o potwierdzonej skuteczności. Leczenie pacjentów opiera się na rekonwalescencji zainfekowanych układów (sercowo-naczyniowego, wydalniczego i oddechowego), gdzie płynoterapia, kontrola gospodarki elektrolitowej oraz zapobieganie niedociśnieniu odgrywają kluczową rolę. Mimo wprowadzenia odpowiedniej opieki medycznej, szacuje się, że w ciągu 48h umiera około 1/3 pacjentów zakażonych orthohantawirusami [43, 51].

Istotą leczenia zespołu płucnego jest płynoterapia, stosowanie respiratora oddechowego oraz kontrola pracy serca. W przypadku zaburzeń hemodynamicznych, konieczna jest podaż amin wazopresyjnych, natomiast niedociśnienie oraz wstrząs kardiogenny leczy się poprzez zastosowanie, oprócz amin, także albumin, środków o działaniu inotropowym-dodatnim i krystaloidów. Nadmierna ilość płynów w stosunku do leków inotropowych może prowadzić do rozwoju obrzęku płucnego. Podobnie jak w przypadku zespołu nerczycowego, stosowanie kortykosteroidów oraz rybawiryny jest dyskusyjne [7, 43, 51].

Inną metodą terapii ciężkich przypadków hantawirusowego zespołu płucnego jest zastosowanie pozaustrojowego utleniania krwi (ECMO). Badanie Changa i wsp. [12] z 2007 roku wykazało, że metoda ta istotnie zwiększa szanse na przeżycie. Spośród 38 pacjentów z ECMO przeżyło 23. Szacunkowo, bez użycia pozaustrojowego utleniania krwi umierałby każdy pacjent z zespołem płucnym rozwiniętym w stopniu ciężkim. Szacuje się, że metoda ta jest skuteczna w 2/3 przypadków wszystkich zachorowań [8, 12, 32, 51]. Yao i wsp. [63] donieśli natomiast o przypadku ciężkiej infekcji, niepodatnej na terapie, skutecznie wyleczonej dzięki zastosowaniu ECMO [63]. Bugedo i wsp. [8] twierdzą natomiast, że metodą skuteczniejszą od ECMO jest hemofiltracja o dużej objętości (HFAV) [8].

W oparciu o mechanizm działania rybawiryny, stworzono analogi nukleozydów FPI i ETAR, potwierdzając działanie pierwszego w testach *in vitro,* a drugiego – w testach *in vivo* na modelu mysim [51].

W farmakoterapii zakażeń hantawirusowych stosowany jest także lek przeciwgrypowy – arbidol. Środek ten wpływał na redukcję powikłań chorobowych, zmniejszał śmiertelność oraz indukował zmiany stężeń TNF-alfa [51]. Oprócz tego stosuje się także fitoterapię w postaci podaży oksymatryny.

Do metod immunoterapii zalicza się surowice poliklonalne oraz przeciwciała monoklonalne, chroniące przed infekcją lub łagodzące przebieg choroby [51].

Vial i wsp. [61] stosowali na pacjentach zakażonych wirusem Andes, należącym do orthohantawirusów, plazmareferezę oraz osocze. W latach 2008–2012 terapię tę wprowadzono w 29 przypadków infekcji. Śmiertelność przy tym sposobie leczenia wyniosła 14% (4 zgony), nieleczonych natomiast około 30% (101 zgonów na 325 pacjentów z rozpoznaniem zakażenia) [61]. W zakażeniach tym patogenem podawanie wandetanibu również przynosi korzyści w postaci redukcji wysięków [4].

Leczenie gorączki krwotocznej polega na podaży elektrolitów, tlenu oraz płynów (krystaloidy i koloidy), a w przypadku niewydolności nerek, kwasicy, braku odpowiedzi na środki moczopędne lub hiperkaliemii i- dializoterapii. Wymagana jest stała kontrola poziomu jonów w celu zapobiegnięcia rozwoju wielomoczu. Podaż krystaloidów chroni natomiast przed niedociśnieniem i ewentualnym wstrząsem hipowolemicznym, a podaż koloidów – przed powstawaniem obrzęków. Jeśli nie udaje się uzyskać oczekiwanych wartości ciśnienia, możliwe jest stosowanie leków wazokonstrykcyjnych, do których należą m.in. adrenalina czy dopamina [43, 51].

W przypadku wystąpienia skazy krwotocznej oraz następczego krwawienia, konieczna jest transfuzja krwi i zastosowanie farmakoterapii w postaci antagonistów receptorów H2 lub inhibitorów pompy protonowej. Świeżo mrożone osocze oraz plazmaferezę stosuje się, kiedy dochodzi do powstania zespołu DIC (zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego) [43, 51].

W leczeniu gorączki krwotocznej znajdują zastosowanie także glikokortykosteroidy, jednak brakuje badań jednoznacznie potwierdzających ich skuteczność. Dowiedziono natomiast, że leki te cofają patologiczne zmiany w układzie oddechowym, a także podnoszą liczbę trombocytów w przebiegu zakażeniem wirusem Puumala [43, 51].

Innym lekiem podawanym chorym z HFRS jest rybawiryna. Jej skuteczność opiera się na nie poznanym dotąd mechanizmie, jednak stwierdzono, że podana w początkowym okresie choroby zwiększa odsetek przeżyć [32, 43, 51].

W przypadku zakażeń hantawirusami osób (głównie dzieci z niedoborami odporności na skutek hemofagocytarnej limfohistocytozy), niezbędne jest zastosowanie immunochemioterapii, która pozwala redukować groźny stan zapalny i znacząco zmniejsza śmiertelność w tej grupie pacjentów. Inną metodą jest podawanie antygenu limfocytów T- CAR (chimeric antigen receptor T cell), wiążącą się jednak z wystąpieniem stanu zapalnego, w którego powstawaniu najprawdopodobniej bierze udział interleukina-6 [32].

7. Diagnostyka

Wśród najczęstszych odchyleń w badaniach laboratoryjnych występujących zarówno w przypadku HPS (hantawirusowy zespół płucny, głównie w Ameryce Północnej i Południowej) jak i HFRS (gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym, głównie w Europie i Azji) wymienia się: trombocytopenia, leukocytoza, białkomocz, krwiomocz, podwyższone stężenie kreatyniny, podwyższony hematokryt. W zależności od zajętego przez proces chorobowy organu, wystąpić mogą również inne odchylenia w badaniach [11, 15, 33, 35, 40, 57].

W trakcie procesu diagnostyki laboratoryjnej standardowo nie wykonuje się izolacji hantawirusów na drodze hodowli komórkowej ze względu na żmudność i czasochłonność procedury, konieczność posiadania specjalnie wykwalifikowanego personelu i laboratorium spełniającego normy 3 klasy bezpieczeństwa biologicznego. Zakażenia hantawirusami przebiegające pod postacią HPS czy HFRS mają gwałtownie postępujący przebieg i mogą zostać mylnie zinterpretowane jako leptospiroza, zespół hemolityczno-mocznicowy bądź zakażenie septyczne. Z tego względu, kluczowe w kontekście diagnostyki zakażenia hantawirusami jest zastosowanie szybkich testów o wysokiej swoistości. Obecnie stosowane czułe metody diagnostyczne opracowano w oparciu o zdolność do wykrywania genomu wirusowego lub swoistych przeciwciał występujących w surowicy krwi [11, 16, 33].

Większość testów diagnostycznych służących do wykrywania zakażenia hantawirusami opiera się o badania serologiczne np. metody immunofluorescencyjne, immunoblot czy ELISA. Obecność przeciwciał klas zarówno IgM, jak i IgG, w zdecydowanej większości przypadków może zostać stwierdzona już w momencie pojawienia się pierwszych objawów klinicznych. Metoda ELISA może zostać skutecznie wykorzystana niezależnie od fazy przebiegu zakażenia, a jej niewątpliwymi zaletami jest czułość, łatwość wykonania i niski koszt. Niestety, w przypadku testów ELISA może wystąpić reakcja krzyżowa z nieswoistymi przeciwciałami IgM, co może w rezultacie dać wynik fałszywie dodatni badania [11, 29, 33].

W sytuacjach, gdy wyniki testów ELISA budzą wątpliwości co do obecności zakażenia, często wykorzystywaną metodą o większej czułości i swoistości jest immunoblot. Główną wadą dotyczącą wykorzystania w trakcie diagnostyki metod immunoblot jest większy koszt oraz dłuższy czas przeprowadzenia w stosunku do ELISA [33].

Inną metodą, którą można zastosować w celu diagnostyki zakażenia hantawirusami, jest test neutralizacji. W tym sposobie wykorzystuje się przeciwciała neutralizujące, których cel stanowią białka otoczki wirusa. Test ten cechuje się najwyższą swoistością, ale jest kosztowny, wymaga dużej ilości czasu i jest trudny do przeprowadzenia [33].

Sposobem na łatwe zidentyfikowanie genomu hantawirusa we krwi lub ślinie jest wykorzystanie reakcji PCR z odwrotna transktyptazą (ang. *RT-PCR*, *Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction*) z odwrotną transkryptazą. Metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością oraz krótkim czasem przeprowadzenia. PCR z odwrotną transkryptazą umożliwia rozpoznanie zakażenia hantawirusowego tylko w trakcie fazy wiremii (wczesna faza zakażenia) i jest droższy w stosunku do metod serologicznych. Jego droższą alternatywę stanowi reakcja PCR w czasie rzeczywistym, do którego zalet należy jeszcze szybszy czas przeprowadzenia i mniejsze ryzyko zanieczyszczenia materiału badawczego. Niemniej jednak poważnym ograniczeniem w powszechnym stosowaniu metod PCR pozostaje ich użyteczność tylko w trakcie ostrej fazy zakażenia [29, 33].

W trakcie diagnostyki zakażenia hantawirusami, najlepszą metodą pozostaje połączenie testów serologicznych (np. ELISA) z metodami PCR, umożliwiającymi identyfikację na podstawie struktury genomu wirusa, np. RT-PCR. W celach identyfikacji i klasy-

fikacji nowych szczepów wirusów zachodzi konieczność wykorzystania metod umożliwiających ustalenie sekwencji nukleotydowych wirusa [33, 57].

8. Profilaktyka – szczepionki

Szczepionki znacznie przyczyniają się do kontroli chorób zakaźnych. Również w przypadku hantawirusów udało się uzyskać wystarczająco wysokie miana, dzięki inokulacji wirusa do mózgów gryzoni. Inaktywowane szczepionki przeciwko gorączce krwotocznej z zespołem nerkowym (HFRS, ang. *hemorrhagic fever with renal syndrome*) zostały opracowane i przetestowane na ludziach w Azji, aczkolwiek nie zostały dopuszczone do użytku w Stanach Zjednoczonych. Nie ma również dostępnych szczepionek przeciwko HFRS w Europie, a także nie prowadzi się w tym kierunku żadnych badań naukowych, ani nie podejmuje prób otrzymania licencji na szczepionki azjatyckie mimo, że spełniają europejskie standardy. Pochodzą one zarówno z mózgów gryzoni, jak i hodowli bakteryjnej (powstałej na skutek pobrania patogenów od osoby zainfekowanej), aczkolwiek nie są popularne w krajach zachodnich, ze względu na obawę, że mogłyby prowadzić do autoimmunologicznego zapalenia mózgu. W konwencjonalnych szczepieniach stosowana jest inaktywowana szczepionka Hantavax®, czyli inaktywowana szczepionka, pochodząca z mózgów myszy, stosowana w Korei Południowej od 1991 roku. Preparat z mysich mózgów zostaje inaktywowany za pomocą formaliny, a następnie dodaje się do niego wodorotlenek glinu. Hantavax® spełnia wymogi dla produktów biologicznych, takie jak siła działania, sterylność, bezpieczeństwo, pH, odpowiednie stężenie formaliny. Według wytycznych z 1991 roku szczepionkę podaje się w dwóch seriach, w odstępnie jednego miesiąca, a po 12 miesiącach należy podać dawkę przypominającą. Szczepienie wyzwala odpowiedź przeciwciał w większości przypadków, ale tylko w połowie obecne były przeciwciała neutralizujące. Liczba hospitalizacji z powodu HFRS w Korei Południowej zmalała w latach 1991–1997 z 1234 do 415 przypadków. Song i wsp. [55] przeprowadzili badanie, które wykazało, że podanie dwóch dawek Hantavaxu® zazwyczaj nie powoduje immunogenności. Zalecili więc zmianę w podawaniu dawki przypominającej. Podanie dodatkowej dawki po 2–6 miesiącach wydaje się rozsądniejsze, gdyż indukuje odpowiedź seropozytywną, która utrzymuje się około 2 lat i gwarantuje ochronę u osób narażonych. Na wydłużenie okresu immunogenności może wpływać obecność kilku genów związanych z immunoglobulinami, np. NAMPT przedłużające życie limfocytów, czy NADSYN1. Oprócz tego odnotowuje się wpływ metabolitów kwasu foliowego (aktywacja odpowiedzi immunologicznej komórkowej) i kwasu arachidonowego (regulacja odpowiedzi, m.in. przy pomocy komórek tucznych) [13, 30, 39, 52, 53, 55].

W Chinach produkuje się nieaktywne szczepionki monowalentne przeciwko HTNV i SEOV z nerek suwaka mongolskiego lub hodowli komórkowej pochodzącej od chomika syryjskiego. W porównaniu do obu powyższych szczepionek przeciwko HTNV, które wyzwalają przeciwciała neutralizujące tylko w połowie przypadków, szczepionka przeciwko SEOV wyzwala je u około 80% pacjentów, którzy przyjęli 3 dawki. Również w Chinach opracowano nieaktywną, biwalentną szczepionkę HTNV/SEOV, składającą się z wyizolowanego HTNV od chorującego na HFRS oraz wyizolowanego ze szczura SEOV. Wirusy te zostały namnożone w komórkach nerkowych chomika, inaktywowane za pomocą formaldehydu, oczyszczone w kolumnie chromatograficznej oraz dodano do nich wodorotlenek glinu. Po 3 dawkach tej szczepionki rozwinęły się przeciwciała neutralizujące przeciwko HTNV w 93% przypadków i przeciwko SEOV w 92% [39, 53, 64].

Również w Rosji stworzono inaktywowaną szczepionkę biwalentną PUUV/DOBV. Użyto szczepów PUUV Ufa-97 i DOBV-Aa Lipetzk-06, które hodowano w komórkach Vero E6 (linii komórkowej wytwarzanej z tkanki nerkowej koczkodana), inaktywowanych za pomocą formaliny, z dodatkiem wodorotlenku glinu. Immunizowane myszy posiadały przeciwciała neutralizujące wobec PUUV oraz DOBV. Szczepionka ta przeszła pozytywnie badania przedkliniczne według wytycznych rosyjskich [34].

Do szczepionek rekombinowanych przeciwko hantawirusom należy szczepionka, w skład której wchodzi rekombinowany wektor zawierający sekwencję wirusa krowianki (VACV; ang. a recombinant vaccinia virus (VACV) – vectored vaccine), wraz z sekwencjami kodującymi białka M i S wirusa HTNV. W I fazie przeprowadzonych badań nie zaobserwowano efektów ubocznych podania szczepionki. Tylko osoby dostające najwyższe dawki wykształciły przeciwciała neutralizujące HTNV. W grupie tej podanie dawki przypominającej po roku wywołało nagły wzrost mian. Również grupa dostająca drugą najwyższą dawkę rozwinęła przeciwciała zobojętniające, ale w tym wypadku podanie dawki przypominającej przypominało bardziej pierwotną reakcję niż reakcję anamnestyczną. W II fazie badań podano dwie dawki podskórne w odstępie 6 tygodni. Przeciwciała neutralizujące pojawiły się w 72% przypadków, ale jedynie w 26% przypadków doszło do odpowiedzi na HTNV. Z tego powodu nie kontynuowano badań [53].

Kolejną szczepionką molekularną, która została dopuszczona do badań klinicznych, jest szczepionka DNA. Plazmidowe DNA wstrzykuje się za pomocą pistoletu genowego. Ponieważ szczepionki DNA nie posiadają składników białkowych, nie powinny pro-

wadzić do immunizacji. Wykazują również odporność krzyżową u zwierząt wśród HTNV, SEOV i DOBV. Do tej grupy nie zalicza się PUUV. Z tego powodu do szczepionki należy dodać zarówno komponentę HTNV (albo SEOV lub DOBV) oraz PUUV. Szczepionki DNA zostały przetestowane na zwierzętach i dopuszczone do I fazy badań klinicznych. W badaniu wzięły udział 3 grupy po 9 ochotników, którzy otrzymywali HTNV, PUUV, albo HTNV+PUUV w odstępie 4 tygodni. Wszystkie szczepionki składały się z dawki całkowitej 2 mg DNA w objętości 1ml soli fizjologicznej. Szczepionki podawane były domięśniowo. Nie stwierdzono żadnych efektów ubocznych związanych z przeprowadzanym badaniem. Po trzech szczepieniach przeciwciała neutralizujące wykryto u 5 z 7 szczepionych HTNV i 7 z 9 szczepionych PUUV. W grupie HTNV+PUUV przeciwciała neutralizujące znaleziono u 7 z 9 ochotników. Trójka ochotników z najsilniejszą odpowiedzią na szczepionkę przeciw PUUV wykazywało także silne przeciwciała neutralizujące wobec HTNV. Badanie udowodniło, że szczepionki DNA przeciw HTNV i PUUV podawane zarówno oddzielnie, jak i razem, są bezpieczne. Obie szczepionki były immunogenne, ale kiedy połączono je razem, okazało się, że więcej uczestników badania reagowało na PUUV niż na HTNV [25, 53].

Szczepionki przeciwko hantawirusom opracowuje się głównie w Korei Południowej i Chinach, ze względu na częstość występowania zakażeń hantawirusami w tych krajach. Przeszkodą w produkcji skutecznych szczepionek jest różnorodność szczepów w różnych regionach. W ramach profilaktyki zakażeń powinno zwiększać się świadomość ludzi oraz unikać źródeł zakażenia, kontaktu z chorymi i poprawiać warunki sanitarne [64].

9. Podsumowanie

Do zarażenia wirusami z rodzaju Orthohantavirus spp. dochodzi najczęściej poprzez kontakt z wydzielinami i odchodami gryzoni, najczęściej drogą wziewną, jednak opisywane są także przypadki infekcji w wyniku transfuzji składników krwi. Replikacja wirusów odbywa się przede wszystkim w śródbłonku naczyń krwionośnych, głównie nerek i płuc. Wyróżnia się 2 główne zespoły chorobowe powodowane przez te wirusy: HPS (hantawirusowy zespół płucny) i HFRS (gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym). W przebiegu HPS wyróżnia się 2 fazy: wczesną i późną. Do głównych objawów należą gorączka, kaszel, trudności z oddychaniem obrzęk płuc, tachypnoe i tachykardia, jednak może dojść także do niewydolności oddechowej i wstrząsu kardiogennego. Przebieg HFRS podzielony został na 5 faz. Charakterystyczna triada objawów zawiera gorączkę, niewydolność nerek i krwawienia. Śmiertelność zależy od gatunku wirusa. Terapia przeciwhantawirusowa o potwierdzonej skuteczności na ten moment nie istnieje. W leczeniu stosuje się przede wszystkim zbilansowaną płynoterapię, kontrolę gospodarki elektrolitowej oraz zapobieganie niedociśnieniu, a w skrajnych przypadkach – podawanie tlenu bądź stosowanie respiratora oddechowego. W przypadku skazy krwotocznej wymagana jest transfuzja krwi lub jej składników. Do głównych odchyleń w badaniach laboratoryjnych należą leukocytoza, trombocytopenia, podwyższony hematokryt, krwiomocz i białkomocz oraz podwyższone stężenie kreatyniny. Testy diagnostyczne w większości przypadków opierają się na badaniach serologicznych.

Piśmiennictwo

1. Abudurexiti A., Kuhn J.H. i wsp.: Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Arch. virol.* **164**, 1949–1965 (2019)
2. Anderson D., Beecher G., Power C., Bridgland L., Zochodne D.W.: A neuropathic pain syndrome associated with hantavirus infection. *J. Neurovirol*. **23**, 919–921 (2017)
3. Bi Z., Formenty P.B.H., Roth C.E.: Hantavirus infection: a review and global update. *J. Infect. Develop. Countr*. **2**, 3–23 (2008)
4. Bird B.H., Shrivastava-Ranjan P., Dodd K.A., Erickson B.R., Spiropoulou C.F.: Effect of Vandetanib on Andes virus survival in the hamster model of Hantavirus pulmonary syndrome. *Antivir. Res.,* **132**, 66–69 (2016)
5. Borges A.A., Campos G.M., Moreli M.L., Souza R.L.M., Saggioro F.P., Figueiredo G.G., Figueiredo L.T.M.: Role of mixed Th1 and Th2 serum cytokines on pathogenesis and prognosis of hantavirus pulmonary syndrome. *Microb. Infect.* **10**, 1150–1157 (2008)
6. Bridson E.: The English 'sweate' (Sudor Anglicus) and Hantavirus pulmonary syndrome *Brit J Biomed Sci.* **58**, 1–6 (2001)
7. Brocato R.L., Hooper J.W.: Progress on the Prevention and Treatment of Hantavirus Disease. *Viruses*. **11**, 610 (2019)
8. Bugedo G., Florez J., Ferres M., Roessler E., Bruhn A.: Tratamento bem-sucedido da síndrome cardiopulmonar por hantavírus com uso de hemofiltração de alto volume. *Rev. bras. ter. Intens*. **28**, 190–194 (2016)
9. Bugert J.J., Welzel T.M., Zeier M., Darai G.: Hantavirus infection-haemorrhagic fever in the Balkans-potential nephrological hazards in the Kosovo war. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 1843–1844 (1999)
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Outbreak of acute illness-southwestern United States, 1993. *MMWR*. **42**, 421 (1993)
11. Chandy S., Mathai D.: Globally emerging hantaviruses: An overview. *Indian J med. Microbiol.* **35**, 165–175 (2017)
12. Chang B., Crowley M., Campen M., Koster F.: Hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Sem. Resp. Crit. Care Med*. **28,** 193–200 (2007)
13. Cho H.W., Howard C.R., Lee H.W.: Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology*, **45**, 328–333 (2002)
14. Cifuentes-Muñoz N., Salazar-Quiroz N., Tischler N.D.: Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses*. **6**, 1801–1822 (2014)
15. Clement J., LeDuc J.W., McElhinney L.M., Reynes J.M., Van Ranst M., Calisher C.H.: Clinical characteristics of ratborne seoul hantavirus disease. *Emerg. Infect. Dis*. **25**, 387–388 (2019)

16. Clement J., Lee A.P.K., Verpooten G.A., Laenen L., Vergote V., De Samblanx H., Berneman Z.N., Van Ranst M., Maes P.: Acute hantavirus infection presenting as haemolytic-uraemic syndrome (HUS): the importance of early clinical diagnosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 135–140 (2018)
17. Cosgriff T.M.: Mechanisms of disease in Hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 97–107 (1990)
18. Elliott R.M.: Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* **71**, 501–522 (1990)
19. Freiberg A.N., Bente D.A., Le Duc J.W.: Bunyaviruses: Hantavirus and others. *Viral Infect. Hum.* 173–197 (2014)
20. Friedewald V.E.: Hantavirus Pulmonary Syndrome (w) Clinical Guide to Bioweapons and Chemical Agents, Springer, 2008, s. 84–87
21. Gavrilovskaya I., Gorbunova E., Koster F., Mackow E.: Elevated VEGF levels in pulmonary edema fluid and PBMCs from patients with acute hantavirus pulmonary syndrome. *Adv. Virol.* doi:10.1155/2012/674360 (2012)
22. Golovljova I., Vasilenko V., Mittženkov V., Prükk T., Seppet E., Vene S., Settergren B., Plyusnin A., Lundkvist A.: Characterization of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by hantaviruses, Estonia. *Emerg. Infecti. Dis.* **13**, 1773–1776 (2007)
23. Heyman P., Simons L., Cochez C.: Were the English sweating sickness and the Picardy sweat caused by hantaviruses? *Viruses* **6**, 151–171 (2014)
24. Hjelle B.: Hantavirus, with emphasis on four corners hantavirus, https://s1.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/library/multimedia-virology/hanta.html (02.05.2020)
25. Hooper J.W., Moon J.E., Paolino K.M., Newcomer R., McLain D.E., Josleyn M., Schmaljohn C.: A Phase 1 clinical trial of H antaan virus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 110–117 (2014)
26. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV, https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ (05.05.2020)
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS), https://www.cdc.gov/hantavirus/hps/index.html (05.05.2020)
28. Jonsson C.B., Figueiredo L. Vapalahti O.: A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbial. Rev.* **23**, 412–441 (2010)
29. Kalaiselvan S., Sankar S., Ramamurthy M., Ghosh AR., Nandagopal B., Sridharan G.: Prediction of B cell epitopes among hantavirus strains causing hemorragic fever with renal syndrome. *J. Cell. Biochem.* **118**, 1182–1188 (2017)
30. Khan A., Kim W.J. i wsp.: A Systems Vaccinology Approach Reveals the Mechanisms of Immunogenic Responses to Hantavax Vaccination in Humans. *Sci. Rep.* **9**, 4760 (2019)
31. Klempa B., Koivogui L., Sylla O., Koulemou K., Auste B., Krüger D.H., ter Meulen J.: Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa. *J. Infect. Dis.* **201**, 1031–1034 (2010)
32. Klingström J., Smed-Sörensen A., Maleki K.T., Solà-Riera C., Ahlm C., Björkström N.K., Ljunggren H.G.: Innate and adaptive immune responses against human Puumala virus infection: immunopathogenesis and suggestions for novel treatment strategies for severe hantavirus-associated syndromes. *J. Intern Med.* **285**, 510–523 (2019)
33. Kruger D.H., Figueiredo L.T.M., Song J.W., Klempa B.: Hantaviruses-globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* **64**, 128–136 (2015)
34. Krüger D.H., Schönrich G., Klempa B.: Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. *Hum. Vaccin*. **7**, 685–693 (2011)
35. Krumm P., Zitzelsberger T., Gawaz M., Greulich S.: Young patient with hantavirus-induced myocarditis detected by comprehensive cardiac magnetic resonance assessment. *BMC Infect. Dis.* **19**, 15 https://doi.org/10.1186/s12879-018-3658-8 (2019)
36. Kulzer P., Heidland A.: Acute kidney failure caused by Hantaviruses. *Ther Usmch.* **51**, 824–831 (1994)
37. MacNeil A., Nichol S.T., Spiropoulou C.F.: Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res.* **162**, 138–147 (2011)
38. MacNeil A., Ksiazek T. G.,. Rollin P. E.: Hantavirus pulmonary syndrome, United States, 1993–2009. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1195–1201 (2011)
39. Maes P., Clement J., Van Ranst M.: Recent approaches in hantavirus vaccine development. *Exp. Rev. Vac.* **8**, 67–76 (2009)
40. Maleki K.T., Klingström J. i wsp.: Serum Markers Associated with Severity and outcome of hantavirus pulmonary syndrome. *J. Infect. Dis.* **219**, 1832–1840 (2019)
41. Meyer B.J., Schmaljohn C.S.: Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol.* **8**, 61–67 (2000)
42. Mir M.A., Panganiban A.T.: The hantavirus nucleocapsid protein recognizes specific features of the viral RNA panhandle and is altered in conformation upon RNA binding. *J. Virol.* **79**, 1824–1835 (2005)
43. Moore R.A., Griffen D.: Hantavirus Syndrome, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513243/ (05.05.2020)
44. Muranyi W., Bahr U., Zeier M., van der Woude F.J.: Hantavirus infection. *JASN.* **16**, 3669–3679 (2005)
45. Muyangwa M., Martynova E.V., Khaiboullina S.F., Morzunov S.P., Rizvanov A.A.: Hantaviral proteins: structure, functions, and role in hantavirus infection. *Front. Microbiol.* **6**, 1326 doi: 10.3389/fmicb.2015.01326 (2015)
46. Pettersson L., Boman J., Juto P., Evander M., Ahlm C.: Outbreak of Puumala virus infection, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 808–810 (2008)
47. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A.: Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* **77**, 2677–2687 (1996)
48. Plyusnin A.: Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch. Virol.* **147**, 665–682 (2002)
49. Rasmuson J., Andersson C., Norrman E., Haney M., Evander M., Ahlm C.: Time to revise the paradigm of hantavirus syndromes? Hantavirus pulmonary syndrome caused by European hantavirus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 685–690 (2011)
50. Saggioro F.P., Neder L. i wsp.: Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. *J. Infect. Dis.* **195**, 1541–1549 (2007)
51. Sargianou M., Watson D.C., Chra P., Papa A., Starakis I., Gogos C., Panos G.: Hantavirus infections for the clinician: from case presentation to diagnosis and treatment. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 317–329 (2012)
52. Schmaljohn C.S.: Vaccines for hantaviruses: progress and issues. *Expert Rev. Vaccines.* **11**, 511–513 (2012)
53. Schmaljohn C.: Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*, **27**, 61–64 (2009)
54. Schmaljohn C.S.: Molecular biology of hantaviruses (w) The Bunyaviridae, red. Elliott R.M. Springer, Boston, MA, 1996, s. 63–90
55. Song J.Y., Woo H.J., Cheong H.J., Noh J.Y., Baek L.J., Kim W.J.: Long-term immunogenicity and safety of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax™) in healthy adults. *Vaccine*, **34**, 1289–1295 (2016)
56. Spiropoulou C.F.: Hantavirus maturation (w) Hantaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, red. Schmaljohn C.S., Nichol S.T. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 2001, s. 33–46

57. Stojak J.: Hantavirus infections in humans in Poland-current state of knowledge and perspectives for research. *Eur. J. Publ. Health.* **30**, 982–985 (2019)
58. Terajima M., Hayasaka D., Maeda K., Ennis F. A.: Immunopathogenesis of hantavirus pulmonary syndrome and hemorrhagic fever with renal syndrome: Do CD8+ T cells trigger capillary leakage in viral hemorrhagic fevers? *Immunol. Let.* **113**, 117–120 (2007)
59. Thwaites G., Taviner M., Phil M., Gant V., Path C.: The English sweating sickness, 1485 to 1551. *N. Eng. J. Med.* **336**, 580–582 (1997)
60. Vaheri A., Strandin T., Hepojoki H., Sironen T., Henttonen H., Mäkelä S., Mustonen J.: Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 539–550 (2013)
61. Vial P.A., Mertz G.J. i wsp.: A non-randomized multicentre trial of human immune plasma for treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome caused by Andes virus. *Antivir. Ther*. **20**, 377–386 (2015)
62. Xu F., Yang Z., Wang L., Lee Y.-L., Yang C.-C., Xiao S.-Y., Xiao H., Wen L.: Morphological characterization of hantavirus HV114 by electron microscopy. *Intervirology*, **50**, 166–172 (2007)
63. Yao H., McDonald E.G.: Extracorporeal membrane oxygenation for the treatment of severe refractory hantavirus cardiopulmonary syndrome. *CMAJ*. **188**, 528–530 (2016)
60. Zou L.X., Chen M.J., Sun L.: Haemorrhagic fever with renal syndrome: literature review and distribution analysis in China. *Int. J. Infect. Dis.* **43**, 95–100 (2016

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2021, 60, 1, 103–105

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 4 z 2020 r. kwartalników Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

1. Na dzień 01.01 2021 r. około 1/3 członków PTM nie opłaciło składki członkowskiej za 2020 r. Oddziały Terenowe PTM przypominały poszczególnym osobom o tym obowiązku. Na początku marca 2021 r. sekretariat ZG PTM wysłał ponad 150 e-maili i 40 listów (brak adresów e-mailowych) do osób, które nadal nie uregulowały składek za 2020 r. W przypadku ich nieuregulowania do 15.03.2021 r. ZG PTM podejmie uchwałę o usunięciu z listy PTM członków z nieopłaconą składką roczną za 2020 r.
2. Na jesieni 2020 r. zwrócono się do PTM z prosba o opłacenie składki dotyczącej przynależności Polski do European Union of Medical Specialists, Section of Medical Microbiology (https://uems-smm.eu/uems-smm/). Prezydium ZG PTM stoi na stanowisku, że PTM mogłoby zapłacić część, ale nie całość składki do UEMS. Inicjatywa udziału Polski w UEMS wyszła od Naczelnej Izby Lekarskiej i uważamy, że ona powinna płacić część składki. Przez 12 lat kontakt z UEMS miało Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej i uważamy, że ono również powinno płacić część składki. PTM zrzeszające mikrobiologów pracujących w różnych obszarach mikrobiologii, o sprawie UEMS dowiedziało się dopiero w 2020 r., gdy pojawiła się kwestia opłacania składki.. Nie mamy wiedzy, aby wcześniej NIL czy TMK sygnalizowały PTM powyższą sprawę. Nie proponowano wyboru przedstawiciela PTM do UEMS. Jednakże ze względu na fakt, że część zrzeszonych osób to lekarze zajmujący się mikrobiologią kliniczną deklarujemy gotowość wniesienia 1/3 opłaty. Uważamy, że Pani Prof. dr hab. Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat jest delegatem PTM do UEMS.
3. Podpisaliśmy umowę z Panem Dawidem Ceculą dyrektorem firmy Exeley Co, wydającym czasopisma PTM on-line dotyczącą przedłużenia umowy wydawniczej obejmującej Polish Journal of Microbiology, na lata 2021 i 2022.
4. Bardzo dobrze rozwija się nasze czasopismo Polish Journal of Microbiology. Okazało się, jednak że do codziennej pracy redaktorskiej nad zeszytami Polish Journal of Microbiology nie wystarcza darmowy Dropbox (pojemność 2 Gb), W Dropbox przechowywane są wszystkie wersje manuskryptu, formalne dokumenty, odpowiedzi dla recenzentów, itp. Takie są wymogi międzynarodowe dla czasopism w PubMed. W związku z tym zakupiono płatny Dropbox (5 Tb),
5. Po raz pierwszy w historii PTM, w 2020 r. przychody Polish Journal of Microbiology były wyższe od poniesionych kosztów. Zysk ten był na tyle wysoki, że pokrył straty wydawnicze czasopisma Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology w 2020 r. Tym samym realizuje się długofalowa polityka władz PTM, aby czasopisma PTM przynosiły zysk Towarzystwu, a nie straty.
6. Władze Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wyraziły zgodę na przedłużenie do 31.12.2021 r. umowy WUM-PTM dotyczącej użyczenia pokoju dla potrzeb ZG PTM na dotychczasowych warunkach finansowych.
7. PTM objęło patronatem konferencję on-line „III Ogólnopolskie Spotkanie Mikrobiologów i Epidemiologów" organizowaną w dniu 01.03.2021 r. przez Konsultanta Wojewódzkiego w dziedzinie Mikrobiologia Lekarska Panią prof. dr hab. Ewę Augustynowicz-Kopeć. https://www.webinar-med.pl/osme/.
8. W bieżącym roku podjęto **Uchwałę 1-2021** o honorariach dla członków redakcji Polish Journal of Microbiology w 2021 r., **Uchwałę 2-2021** o honorariach dla członków redakcji Advancements of Microbiology w 2021 r. oraz **Uchwałę 3-2021** o kontynuacji współpracy z Zakładem Wydawniczym Letter Quality reprezentowanym przez Panią Romę Walendzewicz, dotyczącej sporządzania składu i druku cyfrowego oraz dystrybucji papierowych zeszytów czasopism PJM i PM.
9. Na bieżąco uaktualniamy stronę internetowa PTM, zamieszczając na niej informacje m.in. o stypendiach i spotkaniach on-line.
10. Zostały zapłacone składki członkostwa PTM w FEMS i IUMS za 2021 r.
11. Sprawozdanie finansowe PTM za rok 2020 przygotowane przez naszą Panią księgową wykazało, że Towarzystwo osiągnęło niewielki zysk finansowy w ocenianym okresie, niewątpliwie dzięki przychodom z wydawania PJM.
12. Przygotowujemy doroczne zebranie Zarządu Głównego PTM, które odbędzie się on-line w dniu 22.03.2021 r. Zostaną podjęte ustalenia dotyczące organizacji Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM oraz Walnego Zjazdu Delegatów PTM w 2021 r.

Warszawa, 10.03.2021 r.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
14-17 WRZEŚNIA 2021,
WARSZAWA
PTM
POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
14-17 WRZEŚNIA 2021,
WARSZAWA
Miejsce Zjazdu:
Sangate Hotel Airport
Warszawa, ul. Komitetu Obrony Robotników 32
(dawniej 17 Stycznia, róg ul. Żwirki i Wigury)
Główny Organizator Zjazdu:
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa
ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.

HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

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

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.

Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń. Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.

Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 06.06.2019 r.

BART Spółka z o.o. Sp. K
ul. Norwida 4, 05-250 Słupno
NIP: 1180741884, KRS: 0000573068
https://bart.pl/, email: info@bart.pl

Firma BART jest producentem i dystrybutorem surowców oraz dodatków dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego. Specjalizujemy się w probiotykach oraz surowcach uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi.
Współpracujemy z renomowanymi producentami: Probiotical, Gnosis, Lesaffre

SPIS TREŚCI

M. Wawszczak, A. Filipiak, M. Majchrzak, S. Głuszek, W. Adamus-Białek – Wybrane aspekty biologii i zastosowań CRISPR-CAS 3
M. Yameen, S. Sattar, A. Khalid, M.A. Aslam, N. Zafar, M.H. Saeed, M.H. Arif, M. Jahangeer, A. Qadeer, S. Hussain, M. Aamir, S. Mukhtar, H. Nasir, A. ShahzadM. Yameen, S. Sattar, A. Khalid, M.A. Aslam, N. Zafar, M.H. Saeed, M.H. Arif, M. Jahangeer, A. Qadeer, S. Hussain, M. Aamir, S. Mukhtar, H. Nasir, A. Shahzad – Novel SARS-CoV-2 pandemic transmission with ongoing antiviral therapies and vaccine design 13
J. Wójcik, M. Tomsia, A. Drzewiecki, R. Skowronek – Tanatomikrobiom – aktualny stan wiedzy i przyszłe kierunki 21
S. Gnat, D. Łagowski, M. Dyląg, A. Nowakiewicz – Ludzki mykobiom w stanach normobiozy i dysbiozy – charakterystyka i metody analiz 31
P. Bigos, R. Czerwińska, M. Pajączkowska, J. Nowicka – Mieszany biofilm jamy ustnej 47
E. Juszczuk-Kubiak, M. Greguła-Kania, B. Sokołowska – Technologie „food-omics" w profilowaniu metagenomu żywności 59
E. Mazur, M.J. Chmiel – Piaskownice jako potencjalne źródło zagrożenia lekoopornymi szczepami *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus* 77
K. Leis, P. Kaczor, A. Baska, J. Kazik, M. Kolan, K. Grudlewska-Buda, N. Wiktorczyk, K. Skowron – Orthohantavirus spp. – przegląd rodzaju 91

KOMUNIKATY, INFORMACJE 103

CONTENTS

M. Wawszczak, A. Filipiak, M. Majchrzak, S. Głuszek, W. Adamus-Białek – Selected aspects of the CRISPR-CAS biology and applications 3
M. Yameen, S. Sattar, A. Khalid, M.A. Aslam, N. Zafar, M.H. Saeed, M.H. Arif, M. Jahangeer, A. Qadeer, S. Hussain, M. Aamir, S. Mukhtar, H. Nasir, A. ShahzadM. Yameen, S. Sattar, A. Khalid, M.A. Aslam, N. Zafar, M.H. Saeed, M.H. Arif, M. Jahangeer, A. Qadeer, S. Hussain, M. Aamir, S. Mukhtar, H. Nasir, A. Shahzad – Novel SARS-CoV-2 pandemic transmission with ongoing antiviral therapies and vaccine design 13
J. Wójcik, M. Tomsia, A. Drzewiecki, R. Skowronek – Thanatomicrobiome – state of the art and future directions 21
S. Gnat, D. Łagowski, M. Dyląg, A. Nowakiewicz – Human mycobiome in normobiosis and dysbiosis states characteristics and analysis methods 31
P. Bigos, R. Czerwińska, M. Pajączkowska, J. Nowicka – Mixed oral biofilm 47
E. Juszczuk-Kubiak, M. Greguła-Kania, B. Sokołowska – "Food-omics" applications in the food metagenom profiling 59
E. Mazur, M.J. Chmiel – Sandboxes as a potential source of dengerous drug-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains 77
K. Leis, P. Kaczor, A. Baska, J. Kazik, M. Kolan, K. Grudlewska-Buda, N. Wiktorczyk, K. Skowron – Orthohantavirus spp. – review of genus 91

NEW REPORTS, INFORMATION 103

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Cena 1 zeszytu 40 zł + VAT 8%