POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Kwartalnik
Tom 51
Zeszyt 3•2012
LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:
PMKMAV 51 (3)
2012

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,52 (2012)
Impact Factor ISI = 0,151 (2012)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

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

REDAKCJA

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

ADRESY REDAKCJI

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 05/304, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl; j.hrebenda@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

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

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

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

Stali recenzenci:

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

Uprzejmie zawiadamiamy P.T. Czytelników, że od dnia 18.07.2012 funkcję Redaktora Naczelnego *Postępów Mikrobiologii* pełnić będzie prof. Jacek Bielecki, zaś jego zastępcą będzie prof. Jerzy Hrebenda

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki *Bacillus subtilis* zawierające geny *hly* i *iap Listeria monocytogenes* w komórkach nabłonkowych linii Int 407. SEM LEO, powiększenie 8500x
(fot. ś.p. Jarosław Wiśniewski – Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW)

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

Nakład 1150, Objętość 11 arkuszy wyd., Papier offser 90 g

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

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 155–166
http://www.pm.microbiology.pl

BADANIA MODELOWE NAD PATOGENEZĄ OSPY PRAWDZIWEJ: WPŁYW ORTOPOKSWIRUSÓW KROWIANKI, OSPY MYSZY I OSPY BYDŁA NA AKTYWACJĘ CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO NF-κB

Justyna Struzik, Marek Niemiałtowski*

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Strategie immunomodulacyjne pokswirusów. 3. Rodzina czynników transkrypcyjnych NF-κB jako cel komórkowy immunomodulacji wirusowej. 4. Interakcje wirusa krowianki (VACV) z NF-κB. 5. Wpływ wirusa ospy myszy (ektromelii; ECTV) na aktywację NF-κB. 6. Interferencja wirusa ospy bydła (CPXV) z aktywacją NF-κB. 7. Podsumowanie

Model studies on smallpox pathogenesis: the influence of vaccinia, mousepox and cowpox orthopoxviruses on the activation of transcription factor NF-κB

1. Introduction. 2. Poxvirus immunomodulatory strategies. 3. The NF-κB family of transcription factors as a cellular target for viral immunomodulation. 4. Interactions between vaccinia virus (VACV) and NF-κB. 5. The influence of mousepox (ectromelia; ECTV) virus on the activation of NF-κB. 6. Cowpox virus (CPXV) interference with the activation of NF-κB. 7. Summary

Abstract: Successful replication of the viral genome and the spreading of progeny virions are ensured by a repertoire of virus-encoded immunomodulatory proteins, which enable avoiding different mechanisms of cell response which are directed against pathogens. These strategies have also been evolved by poxviruses, which are being studied extensively due to the threat of the recurrence of smallpox caused by variola virus (VARV). This work describes three model viruses that are used in smallpox pathogenesis studies: vaccinia virus (VACV), ectromelia virus (ECTV) and cowpox virus (CPXV) and their influence on nuclear factor κB (NF-κB) activation. NF-κB is a widely studied multifunctional transcription factor that regulates both innate and adaptive mechanisms of immune response. The classical pathway of NF-κB activation is stimulated by viral infections; moreover, it can be modified by viral gene products. Poxvirus immunomodulatory proteins that interfere with NF-κB activation can be divided into several groups: ligand inhibitors, intracellular inhibitors of NF-κB, ankyrin repeat (ANK) NF-κB inhibitors and PYRIN domain (PYD) NF-κB inhibitors. The studies on their influence on the host immune response will lead to better understanding of viral pathogenesis and may help in drug and vaccines engineering in the future.

Słowa kluczowe: immunomodulacja, NF-κB, wirus krowianki, wirus ospy bydła, wirus ospy myszy (ektromelii)
Key words: cowpox virus, immunomodulation, mousepox (ectromelia) virus, NF-κB, vaccinia virus

1. Wstęp

Choroby wirusowe od wieków stanowią duże wyzwanie dla ludzi i zwierząt oraz rozwijającej się medycyny. Wiele czynników je wywołujących, jak np. wirus grypy typu A (influenza virus A, H5N1), ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus, HIV), wirus brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus, HPV), jest przedmiotem projektów badawczych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO), prowadzonych w różnych krajach oraz obiektem szczególnie zintensyfikowanych badań nad szczepionkami. W związku ze zmiennością antygenową patogenów takich jak HIV, trwa nieustanny „wyścig zbrojeń" pomiędzy naukowcami a wirusami, z których liczne wciąż stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzkości. Ponadto, wykształcone w toku ewolucji przystosowania, polegające na modulacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, umożliwiają wirusom przetrwanie i efektywną replikację w komórkach gospodarza.

Pokswirusy, ludzkie i zwierzęce dsDNA wirusy o dużym genomie (130–360 kpz), zawierającym zwykle ponad 150 genów, stanowią grupę patogenów zdolnych do efektywnej immunomodulacji. Ich cykl replikacyjny przebiega wyłącznie w cytoplazmie zakażonych komórek, co wyróżnia je spośród innych dsDNA wirusów [52]. Patogeny te należą do rodziny *Poxviridae*, obejmującej dwie podrodziny: *Chordopoxvirinae*, wirusy kręgowców i *Entomopoxvirinae*, wirusy owadów oraz niesklasyfikowane dotąd trzy gatunki wirusów. Do podrodziny *Chordopoxvirinae* zalicza się osiem rodzajów: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* i *Yatapoxvirus*. Rodzaj *Orthopoxvirus* obejmuje wirusy: ospy prawdziwej (variola virus, VARV), krowianki (vaccinia virus, VACV), ektromelii – ospy myszy (ectromelia virus, ECTV), ospy bydła (cowpox virus, CPXV), ospy

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; tel./fax. (22) 59 360 66; email: marek_niemialtowski@sggw.pl

– Wykaz użytych skrótów na końcu pracy

małp (monkeypox virus, MPXV) i inne [68]. VARV, jeden z najbardziej znanych i groźnych wirusów, został pokonany dzięki kampanii masowych szczepień, przeprowadzonej w latach 1967–1977 przez WHO, która w 1980 roku ogłosiła raport o wyeliminowaniu zachorowań na ospę prawdziwą [94]. Pomimo tego osiągnięcia, wciąż istnieje prawdopodobieństwo ponownego pojawienia się ospy ludzkiej, ponieważ nie można wykluczyć istnienia rezerwuaru VARV w przyrodzie. Wirus ten przechowywany jest obecnie w dwóch laboratoriach znajdujących się w USA (US CDC&P, Atlanta) oraz w Rosji (Instytut Wirusologii, Moskwa), a możliwość jego użycia w celu ataku bioterrorystycznego potwierdza zasadność badań modelowych i innych prowadzących do opracowania nowoczesnych, wydajnych preparatów profilaktycznych (np. szczepionek) i leczniczych przeciwko ospie prawdziwej [9, 64]. Warto również zaznaczyć, iż obecnie ortopokswirusy stanowią zagrożenie zarówno dla zwierząt laboratoryjnych (ECTV), jak i hodowlanych czy dziko żyjących oraz są źródłem chorób odzwierzęcych (VACV, CPXV, MPXV). VARV i ECTV wykazują specyficzność w stosunku do jednego gospodarza (odpowiednio: człowiek i mysz), zaś CPXV jest patogenem endemicznym występującym u szczurów i powodującym zakażenia u bydła oraz u ludzi [33].

Zakażenia ortopokswirusowe mogą przybierać formę uogólnioną (ospa myszy), bądź miejscową (ospa bydła) lub obydwie z wymienionych (ospa prawdziwa) i powodują wystąpienie zmian skórnych w postaci wysypki, a uogólniona infekcja może prowadzić do śmierci [55]. Do badań nad patogenezą ospy prawdziwej wykorzystuje się VACV, CPXV i ECTV, który jest naturalnym patogenem genetycznie wrażliwych szczepów myszy [33], używanej jako organizm modelowy do takich doświadczeń.

Niniejsza praca przedstawia różnorodność wykształconych przez ortopokswirusy mechanizmów immunomodulacyjnych, w wyniku których dochodzi do zmian w aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB (nuclear factor κB). Białko to pełni liczne funkcje w komórce i może być uznane za cel terapeutyczny w leczeniu chorób wirusowych.

2. Strategie immunomodulacyjne pokswirusów

Pokswirusy kodują liczne białka, które umożliwiły tym patogenom uniezależnienie się od maszynerii transkrypcyjnej gospodarza, a także, zakłócanie ekspresji genów zakażonych komórek, bez zaburzania ekspresji ich własnych genów [60, 62]. W procesie replikacji genomu pokswirusów biorą udział produkty wysoce konserwatywnych genów, występujących w centralnej jego części, z której region o długości 100 kpz charakteryzuje ponad 90% podobieństwo wśród wirusów z rodzaju *Orthopoxvirus* [30, 40]. Badania nad VACV wykazały, iż około 25% z 200 otwartych ramek odczytu (open reading frames, ORFs) nie jest koniecznych do replikacji tego wirusa *in vitro*, co więcej, wiele z nich koduje białka, które służą modyfikacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza podczas cyklu replikacyjnego VACV. Większość genów, kodujących takie modyfikatory, obecna jest w rejonach terminalnych genomu i charakteryzuje się dużą zmiennością w obrębie rodziny *Poxviridae*, a wystąpienie nawet kilku zmian w sekwencji aminokwasowej izologów białek należących do różnych pokswirusów wiąże się ze zmianą ich specyficzności. Białka te to modyfikatory mechanizmów odpornościowych gospodarza (host-response modifiers, HRMs), uznawane za niezbędne do utrzymania się wirusa w środowisku, ponieważ wpływają na procesy przeciwdziałające jego replikacji i rozprzestrzenianiu się w zakażonym organizmie. Zadaniem HRMs jest bowiem modyfikacja mechanizmów odpowiedzi na zakażenie, procesów syntezy makromolekuł w komórce gospodarza, a także apoptozy [21].

Immunomodulatory pokswirusowe służą „ukrywaniu się" wirusa w komórce, jego transdukcji oraz mimikrze wirusowej [47]. Do takich modyfikatorów należy m.in. białko wczesne M153R, które zostało odkryte u należącego do rodzaju *Leporipoxvirus* wirusa myksomatozy (myxoma virus, MYXV). Występuje ono w retikulum endoplazmatycznym (endoplasmic reticulum, ER) i przeznacza do degradacji w lizosomach białka głównego układu zgodności tkankowej klasy I (major histocompatibility complex class I, MHC-I) związane z β2-mikroglobuliną. Występując w roli ligazy ubikwityny, M153R przyczynia się również do lizosomalnej degradacji CD4 [41, 56]. Takie przystosowania służą unikaniu odpowiedzi ze strony mechanizmów wrodzonych, a także komórkowych mechanizmów obrony przeciwwirusowej, w której uczestniczą komórki „naturalni zabójcy" (natural killers, NK) i limfocyty T cytotoksyczne (cytotoxic T lymphocytes, CTL). Istotnym elementem tej obrony jest apoptoza zakażonych komórek, która podlega skutecznej modulacji przez pokswirusowe białka, takie jak MC159 wirusa mięczaka zakaźnego (molluscum contagiosum virus, MCV) z rodzaju *Molluscipoxvirus*. MC159 zawiera dwie domeny efektorowe śmierci (death effector domains, DEDs), które zapobiegają apoptozie indukowanej przez tzw. receptory śmierci [7]. Inne białko, p28 ECTV, w wyniku interakcji z kaspazą 3, blokuje apoptozę komórek indukowaną przez UV [14]. Do inhibitorów apoptozy należą również wewnątrzkomórkowe serpiny jak, na przykład, białko modyfikujące odpowiedź cytokinową CrmA (cytokine response modifier A) CPXV, które hamuje zarówno wewnętrzny, jak i zewnętrzny szlak apoptotyczny [71]. Białka CrmA i CrmD blokują apoptozę dzięki odpowiednio: inhibicji kaspaz: 1 oraz

8 i poprzez wiązanie czynnika martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) [53, 92]. Wiązanie TNF-α, a także innych molekuł gospodarza, umożliwiają, służące mimikrze wirusowej, modulatory zwane wiroreceptorami i wirokinami. Modyfikatory te ingerują w szlaki zewnątrzkomórkowe, służące regulacji wczesnej odpowiedzi przeciwzapalnej na poziomie dopełniacza, interferonów (interferon, IFN), cytokin prozapalnych, chemokin i czynników wzrostu [47]. Do takich immunomodulatorów zalicza się, między innymi, wirusowy receptor interleukiny 1β (viral IL-1β receptor, vIL1βR), cytokiny odpowiadającej za zapoczątkowanie procesu zapalnego podczas zakażenia i indukującej aktywność wielu innych cytokin o rozmaitych funkcjach. vIL1βR wykazuje podobieństwo sekwencji do zewnątrzkomórkowej domeny receptora IL-1β typu II i zapobiega wiązaniu z nim tej cytokiny. Wiroreceptor ten występuje u VACV, ECTV i CPXV, jakkolwiek różnice w sekwencji aminokwasowej białek kodowanych przez te patogeny mają wpływ na różną zdolność wiązania przez nie IL-1β. Stwierdzono bowiem, iż zdolność ta jest słabsza w przypadku białka kodowanego przez ECTV [21]. Innym, znanym wiroreceptorem jest wirusowy receptor TNF (viral TNF receptor, vTNFR), wiążący TNF-α, cytokinę zaangażowaną w odpowiedź przeciwwirusową. vTNFR występuje pod postacią różnych białek kodowanych przez geny *Crm* CPXV, a ich ortologi obecne są w genomach VARV, ECTV i innych ortopokswirusów.

Do białek kodowanych przez tę grupę patogenów należą także wirokiny, do których zalicza się białka wiążące IL-18 (IL-18 binding proteins, IL-18BPs). IL-18 jest cytokiną prozapalną, indukującą IFN-γ oraz inne cytokiny i chemokiny, a także aktywującą komórki NK. IL-18BPs stanowią rodzinę białek pokswirusowych (występują, między innymi, u VACV, ECTV, MCV), wykazujących duże podobieństwo sekwencji i sposobu wiązania tej cytokiny, lecz niehomologicznych w stosunku do komórkowego receptora IL-18 [1, 31]. Innym białkiem o podobnych właściwościach, wykazującym wysoką konserwatywność w obrębie ortopokswirusów (w przypadku ECTV jedynie szczep Mill Hill nie wytwarza tego białka), jest rozpuszczalny inhibitor chemokin typu CC, wirusowe białko wiążące chemokiny typu CC (viral CC chemokine-binding protein, vCC-CKBP) [83]. Ponadto, ortopokswirusy kodują homologi receptora komórkowego IFN-γ (viral IFN-γ receptor, vIFN-γR), dzięki którym hamują działanie tej cytokiny [84].

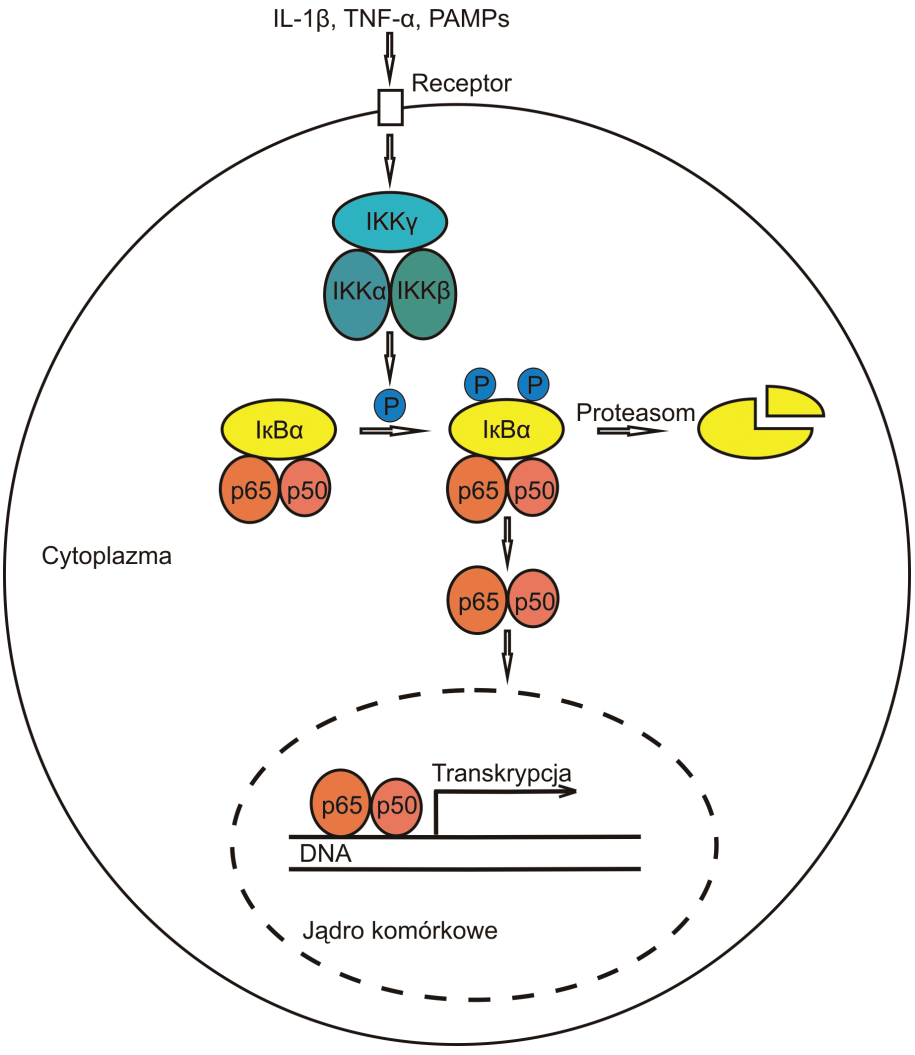
Przedstawiony powyżej repertuar pokswirusowych immunomodulatorów daje obraz wykształconych przez te patogeny w toku ewolucji doskonałych przystosowań, które świadczą o ich wyjątkowych zdolnościach adaptacyjnych. Ze względu na centralną rolę czynnika transkrypcyjnego NF-κB w regulacji procesów związanych ze szlakami komórkowymi, obejmującymi aktywację wyżej wymienionych molekuł, jak również z wrodzonymi i nabytymi mechanizmami odpowiedzi immunologicznej, jest on celem wirusowych mechanizmów immunomodulacyjnych, działających na różnych etapach jego aktywacji.

3. Rodzina czynników transkrypcyjnych NF-κB jako cel komórkowy immunomodulacji wirusowej

Ekspresja genów w komórkach eukariotycznych podlega ścisłej regulacji, która odbywa się głównie na etapie transkrypcji. Przebieg tego procesu uzależniony jest zaś od aktywności białek regulatorowych, zwanych czynnikami transkrypcyjnymi, spośród których NF-κB jest niezwykle popularnym obiektem badań. Wynika to z pełnionych przez to białko licznych funkcji, do których należy, między innymi, regulacja cyklu komórkowego, udział w procesie apoptozy, czy indukcja wrodzonych i nabytych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej podczas zakażeń bakteryjnych i wirusowych. W związku z rolą, jaką NF-κB pełni podczas zakażeń wirusowych, zmiany aktywności tego czynnika powodowane przez niektóre wirusy przyczyniają się do skutecznej replikacji i rozprzestrzeniania się tych patogenów w zakażonym organizmie [44].

Odkrycie w 1986 r. NF-κB, jądrowego czynnika wiążącego sekwencję wzmacniającą genu łańcucha lekkiego κ immunoglobulin [78] w limfocytach B myszy, zapoczątkowało liczne badania nad udziałem tego białka w różnych procesach, w tym w odpowiedzi immunologicznej. Czynnik transkrypcyjny NF-κB, zidentyfikowany również u *Drosophila melanogaster*, występuje u kręgowców jako konserwatywny ewolucyjnie element [39]. Białka z rodziny NF-κB, zwanej również Rel, ze względu na ich homologię z wirusową onkoproteiną v-Rel, charakteryzuje obecność N-terminalnej domeny homologicznej Rel (Rel homology domain, RHD), która uczestniczy w wiązaniu tych czynników z DNA, ich dimeryzacji, translokacji do jądra komórkowego oraz w interakcji NF-κB z białkami inhibitorowymi [37, 69].

Rodzina czynników transkrypcyjnych NF-κB obejmuje pięć ssaczych białek: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50) i NF-κB2 (p52), z których dwa ostatnie powstają w wyniku modyfikacji potranslacyjnych prekursora (odpowiednio: p105 i p100). Wykazano obecność NF-κB w niemal wszystkich typach ssaczych komórek, w których występuje on w postaci homo- i heterodimerów. Białka należące do rodziny NF-κB pełnią rolę zarówno aktywatorów transkrypcji, jak i represorów tego procesu (homodimery p50/p50 lub p52/p52). Induktorem transkrypcji genów jest C-terminalna domena transaktywującą (transactivation domain, TAD) obecna w cząsteczkach trzech białek tej rodziny: p65, RelB i c-Rel. Białko p65 zawiera dwie takie



Rys. 1. Klasyczna droga aktywacji NF-κB

Oddziaływanie czynników, takich jak cytokiny prozapalne (IL-1β, TNF-α) czy molekularne wzorce patogenności (PAMPs) z receptorami na powierzchni komórki prowadzi do aktywacji kinazy IκB (IKK), złożonej z podjednostek IKKα, IKKβ i IKKγ. Aktywna kinaza IKK fosforyluje inhibitor IκBα, który ulega następnie ubikwitynacji i degradacji w proteasomie. Uwolniony czynnik NF-κB w postaci heterodimeru p65/p50 przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję odpowiednich genów.

domeny, dlatego jest ono najsilniejszym aktywatorem tego procesu [76].

NF-κB należy do grupy czynników transkrypcyjnych zwanych utajonymi czynnikami cytoplazmatycznymi, które występują w formie nieaktywnej w cytoplazmie komórki. Ich aktywacja następuje w wyniku wysoce specyficznej reakcji typu polipeptyd-receptor, polegającej na związaniu białkowej molekuły sygnałowej z receptorem powierzchniowym komórki i uruchomieniu kaskady sygnałów wewnątrz komórki [15]. W wyniku takich oddziaływań dochodzi do transkrypcji genów kodujących cytokiny, cząsteczki adhezyjne, enzymy, czy receptory komórkowe, które biorą udział w różnych procesach, w tym obronnych i związanych z zapaleniem [6]. Określeniu roli poszczególnych białek z rodziny NF-κB posłużyły zwierzęta transgeniczne. Myszy z nokautem genu kodującego podjednostkę p65 wykazywały letalny fenotyp embrionalny wraz z rozległą apoptozą komórek wątroby [8]. Uszkodzenie genu *relB* powodowało z kolei atrofię grasicy, a *c-rel* – zmniejszenie produkcji cytokin przez limfocyty T i makrofagi, zaś nokaut genów *nfkb1* i *nfkb2* skutkował upośledzoną reakcją ze strony limfocytów B [20].

Klasyczna droga aktywacji NF-κB (Rys. 1) indukowana jest przez cytokiny prozapalne (IL-1β, TNF-α), receptory Toll-podobne (Toll-like receptors, TLRs) bądź wirusy i stanowi kluczowy element wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej [25, 51]. W przebiegu klasycznej aktywacji NF-κB, występującego w komórkach najczęściej w postaci heterodimeru p65/p50, dochodzi do fosforylacji reszt serynowych (Ser32 i Ser36) inhibitora κBα (inhibitor κBα, IκBα), i, w konsekwencji, odblokowania sekwencji sygnałowej NF-κB, zwanej sygnałem lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal, NLS), która osłaniana jest przez bogatą w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę (proline,

glutamic acid, serine, and threonine, PEST) C-końcową domenę inhibitora. Dzięki temu dochodzi do translokacji NF-κB do jądra komórkowego i degradacji ufosforylowanego i ubikwitynowanego białka IκBα w proteasomie [10, 69]. Centralnym regulatorem tego procesu jest kompleks kinazy IκB (IκB kinase, IKK), który bierze udział w fosforylacji inhibitora. Aktywność IκBα, z kolei, podlega regulacji w ten sposób, iż gen kodujący IκBα znajduje się pod kontrolą NF-κB, w związku z czym zwiększona aktywność inhibitora pomaga w indukcji sekwestracji NF-κB w cytoplazmie [46, 73].

NF-κB może być również aktywowany na drodze alternatywnej lub indukowanej uszkodzeniami DNA. Pierwsza z nich stymulowana jest m. in. receptor limfotoksyny β (lymphotoxin β receptor, LTβR), receptor czynnika aktywującego limfocyty B (B cell activating factor receptor, BAFFR), czy CD40 i obejmuje aktywację IKKα i kinazy aktywującej NF-κB (NF-κB-inducing kinase, NIK) oraz częściową degradację prekursora podjednostki p52, p100. Taki sposób aktywacji NF-κB jest konieczny dla rozwoju i aktywacji limfocytów. Ponadto, ścieżkę tę mogą indukować niektóre wirusy, takie jak ludzki wirus białaczki T-limfocytarnej typu 1 (HTLV-1). Trzecią drogę aktywacji NF-κB, nie obejmującą aktywacji IKK, stymulują czynniki uszkadzające DNA, takie jak związki chemiczne czy UV [25, 27].

Czynnik NF-κB aktywowany jest, jak już wspomniano, podczas zakażeń wirusowych. Co więcej, patogeny te, jak np. HIV typu 1 (HIV-1), HTLV-1, wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus grypy czy adenowirusy, wykazują zdolność do interakcji ze szlakami aktywacji NF-κB, co pozwala uniknąć mechanizmów efektorowych gospodarza. Dodatkowo, w genomie niektórych wirusów, jak HIV, wirus opryszczki pospolitej (HHV-1/HSV-1), adenowirusy, cytomegalowirus (CMV), występują miejsca wiązania tego czynnika transkrypcyjnego, zwane miejscami κB [66], które mogą przyczyniać się do zwiększenia efektywności transkrypcji wirusa. Takie przystosowania pozwalają na ucieczkę przed mechanizmami efektorowymi zakażonego gospodarza i stworzenie warunków sprzyjających skutecznej replikacji genomu wirusowego.

Pokswirusy stanowią grupę patogenów zdolnych do modulacji ścieżek sygnałowych komórki gospodarza w sposób umożliwiający efektywną ich replikację. NF-κB jest szczególnym celem takiej modulacji, ponieważ ekspresja pokswirusowych genów zachodzi w cytoplazmie zakażonej komórki, gdzie czynnik ten ulega aktywacji. Pokswirusowe białka immunomodulatorowe można zaklasyfikować do kilku grup, które obejmują: inhibitory ligandów, wewnątrzkomórkowe inhibitory NF-κB, inhibitory NF-κB zawierające powtórzenia ankirynowe (ankyrin repeats, ANK) oraz inhibitory NF-κB zawierające domenę PYRIN (PYRIN domain, PYD) [60].

4. Interakcje wirusa krowianki (VACV) z NF-κB

Wirus krowianki, VACV, prototypowy patogen o niewyjaśnionym dotąd pochodzeniu, który posłużył do produkcji szczepionki przeciwko ospie prawdziwej, jest popularnym modelem do badań nad patogenezą ortopokswirusów. W przyrodzie istnieje kilka jego wariantów, które mogą być również chorobotwórcze dla człowieka. Należy do nich, uważany za podgatunek VACV, wirus ospy bawołów. Jest on rozpowszechniony na całym świecie i występuje u ludzi, bydła, bawołów i królików, a jego rezerwuarem są głównie gryzonie [29]. VACV przenosi się ze zwierząt na człowieka podczas dojenia, a uszkodzenia skóry strzyków sprzyjają jego transmisji przez dojarzy na inne zwierzęta. Zoonotyczne szczepy VACV, występujące np. w Brazylii, powodują u bydła i ludzi objawy grypopodobne, a także wystąpienie krost i owrzodzeń oraz powiększenie węzłów chłonnych i po kilku tygodniach pozostawiają charakterystyczne blizny [81]. Ponadto, stwierdzono przypadki zakażeń VACV u ludzi pracujących w laboratoriach badawczych [17]. Poza zagrożeniem dla zdrowia publicznego, VACV stanowi źródło strat ekonomicznych. Z drugiej strony jednak, wirus ten jest obecnie bardzo użyteczny, ponieważ wykorzystuje się go jako wektor do konstrukcji szczepionek, na przykład, przeciwko wściekliźnie, a także jako nośnik dużych sekwencji DNA, które nie pozbawiają go zdolności do replikacji [88], co czyni VACV dobrym narzędziem inżynierii genetycznej.

VACV oraz inne ortopokswirusy są obiektem licznych badań, zmierzających, między innymi, do opracowania szczepionki przeciwko ospie prawdziwej – choroby, która wciąż stanowi zagrożenie dla ludzkości. Jak już wspomniano, konserwatywne białka kodowane przez te patogeny wykazują zdolność do modulacji ścieżek sygnałowych związanych z, między innymi, aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF-κB (Tab. I).

W genomie VACV stwierdzono obecność genów kodujących inhibitory ligandów, takie jak wirusowe receptory TNF i IL-1β, a także IL-18BP i wykazano, iż delecja genu VACV szczepu Western Reserve (VACV strain Western Reserve, VACV-WR), kodującego IL-18BP powoduje atenuację tego wirusa [2, 79, 85, 90]. Immunomodulatorowe białka VACV to także wewnątrzkomórkowe inhibitory NF-κB, które mogą mieć wpływ na mechanizmy wrodzone odpowiedzi immunologicznej, przebiegające z udziałem TLRs. Receptory te rozpoznają tzw. molekularne wzorce patogenności (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), do których należą, na przykład, lipopolisacharydy (lipopolysaccharides, LPS) bakterii Gram-ujemnych, kwas lipotejchojowy, białka drożdży, czy kwas nukleinowy wirusów (jedno- lub dwuniciowy RNA) [58]. Zakłócanie przekazywania sygnałów przez TLRs, i, w konsekwencji, interferencja z aktywacją NF-κB zachodzi przy udziale białek VACV,

Tabela I

Białka immunomodulatorowe modelowych ortopokswirusów i ich oddziaływanie z NF-κB

Grupa białek	Funkcja
Inhibitory ligandów	• wiązanie IL-1β, TNF-α, CD153 (wiroreceptory: vIL1βR, vTNFR, vCD30) • wiązanie IL-18 (wirokiny: IL-18BPs)
Wewnątrzkomórkowe inhibitory NF-κB	• zakłócanie przekazywania sygnałów przez IL-1 i TLRs (A46R, A52R, N1L) • hamowanie aktywności IKK (B14) • hamowanie aktywności PKR (E3L, K3L) • hamowanie aktywności ERK2 (M2L)
Inhibitory NF-κB zawierające powtórzenia ankirynowe	• zakłócanie przekazywania sygnałów przez TLRs (K1L) • zapobieganie degradacji IκBα (K1L) • wiązanie i hamowanie aktywacji NF-κB (ECTV-002, CPXV-006, CP77)

A46R i A52R. A46R, dzięki podobieństwu sekwencji aminokwasowej tego białka do cytoplazmatycznej domeny receptora Toll/IL-1 (Toll/IL-1 receptor, TIR), działa jako antagonista przekazywania sygnałów przez IL-1 i TLRs, przy czym ma ono zdolność do częściowej inhibicji aktywacji NF-κB przez IL-1. A52R zaś, efektywnie blokuje aktywację NF-κB indukowaną przez IL-1 oraz TLR4. Odkrycie takich oddziaływań dało możliwość lepszego poznania zależnych od domeny TIR ścieżek sygnałowych, aktywowanych podczas zranień i zakażeń (zwłaszcza wirusowych) i związanych z nimi mechanizmów ucieczki przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza [13]. Dalsze badania nad oddziaływaniem wirusowych białek z TLRs pokazały, iż A52R jest wewnątrzkomórkowym inhibitorem sygnałów przekazywanych przez różne rodzaje tych receptorów i, w konsekwencji, czynnikiem blokującym aktywację NF-κB. Szczególnym celem takiej immunomodulacji jest TLR3, który, jako receptor wirusowego RNA, jest istotnym elementem odpowiedzi wrodzonej podczas zakażeń spowodowanych tymi patogenami [58]. Wykazano również, iż zarówno A52R, A46R, jak i inne białka VACV: N1L oraz K1L, wykazują zdolność do hamowania w pierwotnych komórkach mikrogleju szlaków sygnałowych zależnych od TLRs. Jest to istotne odkrycie ze względu na ważną rolę komórek mikrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), gdzie indukują one wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko patogenom [70].

Kluczowym regulatorem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej podczas zakażeń wirusowych jest podjednostka IKKβ kinazy IKK [24]. IKK jest zatem doskonałym celem dla patogenów, takich jak pokswirusy, które oddziałują z IKK za pomocą konserwatywnego w obrębie rodziny *Poxviridae* białka B14 [22]. Ten wewnątrzkomórkowy czynnik wirulencji został odkryty u VACV-WR, a jego ekspresja w komórkach linii HeLa zapobiega aktywacji NF-κB indukowanej przez TNF-α, IL-1β, kwas poli I:C oraz 12-mirystynian, 13-octan forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA). Dowiedziono również, iż zakażenie mutantem VACV z delecją genu *B14R* (vΔB14) skutkuje wyższym poziomem ufosforylowanego białka inhibitorowego IκBα w komórce, przy porównywalnym poziomie IκBα w stosunku do komórek zakażonych wirusem wykazującym ekspresję tego genu. Na tej podstawie stwierdzono, iż B14 oddziałuje na aktywność IKK i dowiedziono istnienie takiego oddziaływania w komórkach linii MEF i HeLa. Dodatkowo zaobserwowano, iż obecność podjednostki IKKβ jest konieczna do interakcji B14 z IKK [23].

Aktywacja NF-κB może ulegać zakłóceniom również na etapie degradacji inhibitora IκBα przez zawierające powtórzenia ankirynowe białko K1L, kodowane przez dziki szczep VACV, zwany Ankara. Insercja, pochodzącego od tego szczepu i zawierającego trzy geny, w tym *K1L*, fragmentu DNA o długości 5,2 kpz do DNA atenuowanego, zmodyfikowanego wirusa krowianki szczep Ankara (modified vaccinia virus Ankara, MVA) i porównanie wpływu zakażenia takim wirusem i VACV-WR (dziki szczep z delecją *K1L*) na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB dała wynik pokazujący, iż K1L odgrywa rolę nie tylko inhibitora NF-κB w komórkach linii RK13, ale również represora transkrypcji genu kodującego TNF, która podlega regulacji przez ten czynnik [80].

Pokswirusy, w tym również VACV, oddziałują także na aktywność kinazy białkowej R, aktywowanej przez dwuniciowy RNA (protein kinase R, PKR). Enzym ten pełni funkcję mediatora odpowiedzi antywirusowej związanej z działaniem IFN oraz aktywuje NF-κB poprzez fosforylację IκB [50], a stymulacja dsRNA komórek z defektem kinazy PKR skutkuje upośledzoną aktywacją NF-κB. Inaktywacja ścieżki sygnałowej kinazy PKR może zachodzić dzięki wiązaniu dsRNA przez białko E3L VACV, co zapobiega aktywacji PKR przez dsRNA. Inne białko VACV, K3L, z kolei, uniemożliwia wiązanie podjednostki α eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (α subunit of eukaryotic translation initiation factor-2, eIF-2α) przez kinazę PKR, przeciwdziałając tym samym fosforylacji eIF-2α. W ten sposób aktywność kinazy zostaje zniesiona, i w efekcie nie zachodzi indukowany przez PKR proces apoptozy,

w którym, oprócz eIF-2α, bierze także udział NF-κB [38, 48]. Dalsze badania dowiodły, iż PKR ulega aktywacji na wczesnym etapie zakażenia VACV, jeśli wirus ten nie wykazuje ekspresji białka K1L, które ma zdolność hamowania aktywacji PKR przez wczesne lub późne transkrypty genów VACV [93].

VACV oddziałuje na aktywację NF-κB również za pomocą wysoce konserwatywnego wśród ortopokswirusów białka M2L, które hamuje aktywność kinazy aktywowanej zewnątrzkomórkowo 2 (extracellular regulated kinase 2, ERK2), indukującej IKK. Badania z życiem komórek linii HEK 293T zakażonych rekombinowanym wirusem MVA, wykazującym ekspresję tego białka, wykazały obniżoną fosforylację ERK2 w wymienionych komórkach. Ponadto, wprowadzenie do tych komórek konstruktu rekombinowanego wirusa MVA powodowało osłabienie migracji NF-κB do jądra komórkowego [36]. Zaobserwowano również kolokalizację M2L z białkami ER i ekspresję tego białka we wczesnych stadiach zakażenia VACV. Kolokalizacja z białkami retikulum oraz obecność sekwencji sygnalnej białka M2L są konieczne do inhibicji NF-κB. Dodatkowo wykazano, iż brak motywu c-końcowego (tzw. ER retention motif) M2L zapobiega hamowaniu NF-κB i nie zaburza procesu translokacji NF-κB do jądra komórkowego. Wyniki tych badań wskazują na udział białka M2L w patogenezie *in vivo* oraz na możliwość regulacji ścieżek sygnałowych związanych z ER podczas zakażeń innymi wirusami [43].

Najnowsze doniesienia wskazują na obecność w genomie VACV genów kodujących niezidentyfikowane dotąd inhibitory NF-κB. Badania przeprowadzone nad mutantem tego wirusa (VV811) z delecjami wszystkich znanych inhibitorów aktywacji NF-κB indukowanej przez TNF-α (łącznie 55 ORFs) wykazały, iż w komórkach linii HeLa zakażonych VV811, translokacja NF-κB do jądra komórkowego ulega zahamowaniu po stymulacji TNF-α lub IL-1β. Ponadto zaobserwowano, że zakażenie VV811 hamuje indukowaną TNF-α degradację IκBα i doprowadza do gwałtownej akumulacji ufosforylowanego białka IκBα w komórkach. Stwierdzono również, że stabilizacja IκBα jest uwarunkowana ekspresją późnego genu VACV. Wyniki tych badań świadczą o tym, iż NF-κB odgrywa znaczącą rolę podczas zakażeń wirusowych [32].

Do badań nad szczepionką przeciwko ospie prawdziwej i innym chorobom zakaźnym wykorzystuje się, wspomniany już, atenuowany i immunogenny szczep MVA [89]. Analiza ekspresji genów komórek linii HeLa zakażonych MVA wykazała zależną od replikacji wirusowego DNA stymulację ekspresji NF-κB, a także zwiększoną ekspresję białka oddziałującego z TRAF (TRAF-interacting protein, TRIP), uczestniczącego w przekazywaniu sygnałów związanych z aktywacją NF-κB [42]. Wyniki te są zgodne z poprzednimi analizami, które wykazały, iż MVA może aktywować NF-κB bez dodatkowej stymulacji przez czynniki środowiska czy też inne, dodatkowe sygnały [65]. Wykazano również gwałtowną fosforylację ERK2 oraz następującą po niej aktywację NF-κB po zakażeniu komórek HEK 293T MVA [57]. Wyniki tych badań potwierdzają hipotezę mówiącą, iż wirusy są zdolne do kontrolowania aktywacji NF-κB oraz do wykorzystywania tego czynnika w celu regulacji ich cyklu życiowego. Zaobserwowano także, że aktywacja NF-κB w komórkach HEK 293T zachodzi na wczesnym etapie replikacji MVA, przy czym degradacja IκBα wymaga zdarzenia zachodzącego jeszcze przed replikacją wirusowego DNA oraz ekspresji genów późnych. Ponadto dowiedziono, iż w komórkach linii CHO, a także HEK 293T oraz RK3 ekspresja genu wczesnego K1L hamuje proces wyczerpywania się puli IκBα po indukcji przez MVA. W komórkach linii MEF zaś, ilość IκBα może być redukowana w zależności od ekspresji PKR (zarówno mysiej jak i ludzkiej), aktywowanej przez dsRNA. Zdolność MVA do generowania zależnej od kinazy PKR odpowiedzi immunologicznej na wczesnym etapie zakażenia, kiedy replikacja wirusa jest osłabiona, czyni go bezpiecznym i skutecznym wirusem szczepionkowym [54].

5. Wpływ wirusa ospy myszy (ektromelii; ECTV) na aktywację NF-κB

Wirus ospy myszy jest, obok VACV, wartościowym modelem do badań nad patogenezą ospy prawdziwej. Wykorzystuje się go również do testowania leków i szczepionek przeciwko ortopokswirusom [16]. ECTV występuje w Europie u gryzoni dziko żyjących, jednak zakażeniu nim mogą ulegać również myszy laboratoryjne, ponieważ ECTV przenosi się z łatwością nie tylko w wyniku bezpośredniego kontaktu, ale również poprzez zanieczyszczoną ściółkę, dlatego zakażenia tym wirusem stanowią duży problem ekonomiczny i naukowy w zwierzętarniach, gdzie prowadzone są różne badania, ze względu na możliwość ich zafałszowania [30, 34].

Zakażenie ECTV następuje w wyniku wniknięcia tego wirusa przez uszkodzoną skórę, w której ulega on replikacji. Proces ten obejmuje następnie miejscowe węzły chłonne (draining lymph nodes, DLN), po czym wirus przedostaje się do krążenia i wówczas dochodzi do wiremii pierwotnej. Następnie ECTV dociera do narządów miąższowych: wątroby i śledziony, w których namnaża się i dostaje się ponownie do krwiobiegu, co skutkuje wiremią wtórną. Wówczas następują zmiany w miejscu wniknięcia wirusa – skórze, gdzie obserwuje się występowanie opuchlizny na skutek reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej [30]. Spośród kilku znanych szczepów tego wirusa, szczep Moscow (ECTV--Moscow, ECTV-MOS) jest jednym z najbardziej zakaźnych [5].

Poszczególne haplotypy myszy różnią się między sobą wrażliwością na zakażenie ECTV. Szczepy myszy genetycznie opornych (np. C57BL6 [H-2^b]) na zakażenie ECTV zdolne są do jego kontrolowania, wskutek czego objawy choroby są słabo wyrażone [19]. U myszy BALB/c (H-2^d) zaś, wrażliwość taka jest wysoka, co skutkuje ich śmiercią około 7. dnia po zakażeniu (d.p.z.), które przybiera formę ostrą przy braku objawów klinicznych. Objawy te mogą jednak wystąpić pomiędzy 10. a 15. d.p.z. Zmiany, które pojawiają się w przebiegu zakażenia ECTV-MOS, są bardzo charakterystyczne i mają postać wysypki. Mogą one ulec przekształceniu w krosty, a te, z kolei, w owrzodzenia ospowe [63, 91]. Ponadto, ECTV, podobnie jak inne ortopokswirusy, może być czynnikiem etiologicznym zapalenia spojówek [49]. Niekiedy zakażenie tym wirusem prowadzi również do samoamputacji ogona lub odnóży wskutek nekrozy [86].

ECTV, podobnie jak inne ortopokswirusy, może wpływać na aktywację NF-κB. Analiza genomu tego wirusa wykazała, iż podobieństwo sekwencji prawego rejonu terminalnego genomu ECTV jest większe do VACV niż w stosunku do pozostałych ortopokswirusów. Dodatkowo, ORFs, kodujące białka związane bezpośrednio z immunomodulacją, zbadane u różnych izolatów ECTV, są wysoce konserwatywne [72]. Białka immunomodulatorowe ECTV powodują wygaszanie miejscowej odpowiedzi wrodzonej w skórze, co służy zapewnieniu skutecznego zakończenia cyklu replikacyjnego wirusa. Do takich czynników zalicza się, wspomniane już, vTNFR, vIL1βR, czy IL-18BP (p13) [12, 83].

Występujące w genomie ECTV ortologi genów VACV kodują białka, które wpływają na metabolizm komórki, w tym na aktywację NF-κB, działając jako m.in. inhibitory ligandów. Transdukcja sygnałów związanych z TNF jest zakłócana przez ECTV dzięki vTNFR [79], zaś IL-18BP ECTV blokuje aktywację NF-κB, która zachodzi na skutek działania IL-18, co zostało stwierdzone na podstawie badań *in vitro* z użyciem ludzkich komórek linii KG-1, w których oczyszczone białko IL-18BP szczepu Naval (ECTV-Naval, ECTV-NAV) hamowało aktywację NF-κB indukowaną przez IL-18. Dodatkowo, wykazano, iż IL-18BP ECTV wykazuje większą zdolność wiązania mysiej IL-18, w porównaniu z ludzką. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku białka CPXV, ponieważ gryzonie są naturalnymi gospodarzami tych patogenów [85].

Badania wykazały również obecność w genomie ECTV genu kodującego wewnątrzkomórkowy inhibitor NF-κB, który należy do rodziny inhibitorów kinazy IκBα i jest odpowiednikiem cytoplazmatycznego białka N1L VACV, w stosunku do którego wykazuje on 93% podobieństwo, a jego hipotetyczną funkcją jest hamowanie przekazywania sygnałów przez TLRs i TNF. Wykazano także, że ECTV koduje odpowiednik cytoplazmatycznego białka K1L, które zapobiega degradacji IκBα, i którego podobieństwo do K1L VACV wynosi 97% [30].

Chordopokswirusy hamują aktywację NF-κB również za pomocą białek zawierających powtórzenia ankirynowe odpowiedzialne za interakcje typu białko-białko. Białka te występują u ECTV, jak również u VARV (białko G1R), jako wysoce konserwatywne molekuły, które poprzez interakcję z NF-κB1/p105 prowadzą do zahamowania aktywacji NF-κB w transfekowanych komórkach. Stwierdzono, iż odpowiednik G1R, białko ECTV-MOS ECTV-002, ma zdolność do inhibicji aktywacji NF-κB indukowanej przez TNF-α w komórkach linii HEK293. W komórkach linii HeLa zaś, hamuje ono TNF-zależną degradację NF-κB1/p105 i translokację podjednostki p65 do jądra komórkowego [59, 60].

6. Interferencja wirusa ospy bydła (CPXV) z aktywacją NF-κB

Do użytecznych modeli służących do badań nad szczepionką przeciwospową zalicza się również wirus ospy bydła, CPXV. Zgodnie z rekomendacją Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency, EMA), szczepionka taka powinna wykazywać skuteczność przeciwko dwóm, innym niż VACV, patogenom należącym do ortopokswirusów. Przed przystąpieniem do prób klinicznych, badania nad szczepionką przeprowadza się na myszach szczepu BALB/c, a jej skuteczność testuje się na małpach, ponieważ do testów takich zaleca się użycie dwóch różnych gatunków ssaków, przy czym początkowa faza doświadczeń powinna być przeprowadzona na modelu zwierzęcia nie należącego do naczelnych [26]. Opracowanie skutecznej szczepionki przeciwospowej przysparza wiele problemów, dlatego opracowuje się nowe modele zakażenia, takie jak, wprowadzony w ostatnich latach mysi model wewnątrznosowego zakażenia CPXV (szczep Brighton). Pomimo iż aktualna wiedza na temat CPXV jako patogenu modelowego jest, w porównaniu z VACV czy ECTV, wciąż niewielka, to model ten wydaje się być wartościowy. W odróżnieniu od ECTV, gdzie wirus wprowadzany jest dostopowo, zakażenie CPXV przeprowadza się wewnątrznosowo, co jest równie skuteczne, jak aerozolizacja. Dodatkowo, CPXV jest wysoce wirulentny dla myszy, a zakażenia nim spowodowane skutkują procesem chorobowym, a nawet zejściem śmiertelnym u ludzi [35]. CPXV, patogen o jednym z największych genomów w obrębie rodzaju *Orthopoxvirus* (~224–228 kpz), ma również prawdopodobnie najszerszy spośród wszystkich wirusów z tej grupy zakres gospodarza i uważany jest, obok MPXV, za główne źródło potencjalnych zakażeń ortopokswirusowych u ludzi [4, 28]. Rezerwuarem CPXV są niektóre gryzonie, które mogą zarażać zwierzęta w zoo lub koty, przenoszące wirusa na człowieka [77]. Zakażenia CPXV obserwuje się także u krów,

u których powoduje on powstanie owrzodzeń strzyków, a kontakt dojarzy z zakażonymi zwierzętami doprowadza do wystąpienia zmian w postaci krost na dłoniach. Zakażenia CPXV u ludzi, po około 7 dniach inkubacji, powodują nagłe wystąpienie gorączki, bólu głowy i mięśni. Objawom tym towarzyszą występujące powszechnie na rękach i twarzy zmiany skórne, a także lokalne powiększenie węzłów chłonnych. Zmiany skórne ustępują w ciągu kilku tygodni, pozostawiając blizny. Jak już wspomniano, choroba ta może kończyć się śmiercią [88].

CPXV, podobnie jak inne ortopokswirusy, ma zdolność do interferencji ze szlakami metabolicznymi komórki, które prowadzą do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB. W doświadczeniach polegających na stymulacji TNF-α bądź kwasem okadaikowym (ocadaic acid, OA) komórek zakażonych CPXV, stwierdzono indukcję fosforylacji IκBα, który nie ulegał jednak degradacji. Zaobserwowano również stopniową redukcję ilości indukowanego TNF-α jądrowego NF-κB (dimery p65/p50), który może wiązać oligonukleotydy zawierające miejsce wiązania κB. Wykazano także udział wczesnych genów wirusowych w zjawisku interferencji CPXV z translokacją NF-κB do jądra komórkowego oraz zaobserwowano, że wirus ten specyficznie hamuje ekspresję genów regulowanych przez NF-κB [65].

Za zdolność CPXV do hamowania aktywności TNF odpowiadają białka: CrmB, C, D i E [45, 53, 74, 82], a także, występujący m. in. u CPXV i ECTV, wirusowy receptor CD30 wiążący CD153 (viral CD30, vCD30). vCD30 CPXV zawiera sekwencję o długości 58 aa, która wykazuje podobieństwo z obszarami wiążącymi ligand zarówno mysiego (59%), jak i ludzkiego (51%) CD30 oraz może wiązać mysi i ludzki CD153 [3, 67, 75]. Jako że CD30 należy do nadrodziny receptorów TNF i jest aktywatorem NF-κB, to dzięki wirusowemu odpowiednikowi tego białka, CPXV może pośrednio oddziaływać na aktywację NF-κB. W podobny sposób patogen ten wpływa na IL-1β, której rozpuszczalny receptor jest produktem genu CPXV [11, 87]. CPXV koduje również, wspomniane wcześniej, białko wiążące IL-18 [85].

W ostatnich latach zidentyfikowano inne białka CPXV wykazujące zdolność do interferencji z aktywacją NF-κB. Jednym z nich jest CP77, które zawiera 9 hipotetycznych powtórzeń ankirynowych oraz C-terminalną domenę o strukturze podobnej do F-box. Struktury te ułatwiają wiązanie tego białka z NF-κB/p65 i kompleksem ligazy ubikwityny E3 typu SCF (Skp-Cullin-F-box). Sugeruje się, iż CP77 służy jako pomost łączący NF-κB i SCF, co umożliwia ubikwitynację i degradację NF-κB w proteasomie. Białko CP77 może być również uznane za podobną do IκB domenę zastępczą, która zakłóca translokację NF-κB do jądra komórkowego. Wykazano także, iż CP77 jest zdolne do blokowania aktywacji NF-κB indukowanej przez IL-1 lub TNF po stymulacji IKK [18]. Analiza genomu CPXV wykazała również obecność genu kodującego homolog białka VARV G1R [59], który zawiera 6 N-terminalnych powtórzeń ankirynowych. Białko to, nazwane CPXV-006 wykazuje także zdolność do interakcji i interferencji z degradacją NF-κB/p105, przez co zapobiega uwalnianiu i migracji NF-κB do jądra komórkowego. Wykazano również, iż CPXV-006 działa powyżej IKK, a delecja genu kodującego to białko przywraca fosforylację IKK i aktywację oraz lokalizację jądrową NF-κB w zakażonych komórkach. Zakażenie komórek linii THP1 CPXV z defektywnym genem białka CPXV-006 skutkowało gwałtowną aktywacją dużych ilości różnych cytokin prozapalnych, których ekspresja podlega regulacji przez NF-κB [61].

W genomie CPXV obecny jest również ortolog genu białka K1L VACV. Produkt tego genu zawiera 6 powtórzeń ankirynowych i wykazuje 96% podobieństwo do K1L, które interferuje z aktywacją NF-κB dzięki przeciwdziałaniu degradacji IκBα [60]. Ponadto stwierdzono, iż CPXV koduje jeszcze kilka innych białek zawierających powtórzenia ankirynowe, jednakże ich funkcja nie została jeszcze poznana. Być może, podobnie jak inne ortopokswirusowe białka tego typu, pełnią one funkcje immunomodulatorowe [4].

7. Podsumowanie

Podczas zakażeń ortopokswirusowych dochodzi do zmian aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB. W niniejszej pracy omówiono to zagadnienie w odniesieniu do modelowych ortopokswirusów, to jest VACV, ECTV i CPXV, gdyż wiedza na temat ich wpływu na aktywność NF-κB, który jest centralnym regulatorem odpowiedzi przeciwzakaźnej o wielokierunkowym działaniu, może pomóc zrozumieć skutki oddziaływania wirusa na metabolizm komórki oraz mechanizmy patogenezy ospy prawdziwej oraz innych chorób wirusowych. Lepsze poznanie mechanizmów aktywacji NF-κB i jego roli podczas zakażenia wirusowego umożliwi z kolei opracowanie efektywnej terapii nakierowanej na kontrolę poziomu ekspresji tego czynnika w komórce oraz może przyczynić się do opracowania skutecznych szczepionek przeciwwirusowych, w tym przeciwko ospie prawdziwej.

Wykaz użytych skrótów:

ANK, powtórzenia ankirynowe (ankyrin repeats); **BAFFR**, receptor czynnika aktywującego limfocyty B (B cell activating factor receptor); **CMV**, cytomegalowirus (cytomegalovirus); **CPXV**, wirus ospy bydła (cowpox virus); **Crm**, białko modyfikujące odpowiedź cytokinową (cytokine response modifier); **CTL**, limfocyty T cytotoksyczne (cytotoxic T lymphocytes); **d.p.z.**, dni po zakażeniu; **DEDs**, domeny efektorowe śmierci (death effector domains); **DLN**, miejscowe węzły chłonne (draining lymph nodes); **ECTV**, wirus ospy myszy (ektromelii; ectromelia virus); **ECTV-MOS**,

ECTV szczep Moscow (ECTV Moscow strain); **ECTV-NAV**, ECTV szczep Naval (ECTV Naval strain); **eIF-2α**, podjednostka α eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (α subunit of eukaryotic translation initiation factor-2); **EMA**, Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency); **ER**, retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum); **ERK2**, kinaza aktywowana zewnątrzkomórkowo 2 (extracellular regulated kinase 2); **HBV**, wirus zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus); **HCV**, wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus); **HHV-1/HSV-1**, wirus opryszczki pospolitej (human herpesvirus 1/herpes simplex virus 1); **HIV**, ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **HIV-1**, HIV typu 1 (HIV type 1); **HPV**, wirus brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus); **HRMs**, modyfikatory mechanizmów odpornościowych gospodarza (host response modifiers); **HTLV-1**, ludzki wirus białaczki T-limfocytarnej typu 1 (human T-cell leukemia virus type 1); **IFN**, interferon (interferon); **IKK**, kinaza IκB (IκB kinase); **IL-18BPs**, białka wiążące IL-18 (IL-18 binding proteins); **IκBα**, inhibitor κBα (inhibitor κBα); **LPS**, lipopolisacharydy (lipopolysaccharides); **LTβR**, receptor limfotoksyny β (lymphotoxin β receptor); **MCV**, wirus mięczaka zakaźnego (molluscum contagiosum virus); **MHC-I**, główny układ zgodności tkankowej klasy I (major histocompatibility complex class I); **MPXV**, wirus ospy małp (monkeypox virus); **MVA**, zmodyfikowany wirus krowianki szczep Ankara (modified vaccinia virus Ankara); **MYXV**, wirus myksomatozy (myxoma virus); **NF-κB**, czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **NIK**, kinaza aktywująca NF-κB (NF-κB-inducing kinase); **NK**, „naturalni zabójcy" (natural killers); **NLS**, sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal); **OA**, kwas okadaikowy (ocadaic acid); **ORFs**, otwarte ramki odczytu (open reading frames); **OUN**, ośrodkowy układ nerwowy; **PAMPs**, molekularne wzorce patogenności (pathogen-associated molecular patterns); **PEST**, prolina, kwas glutaminowy, seryna i treonina (proline, glutamic acid, serine, and threonine); **PKR**, kinaza białkowa R (protein kinase R); **PMA**, 12-mirystynian, 13-octan forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate); **PYD**, domena PYRIN (PYRIN domain); **RHD**, domena homologiczna Rel (Rel homology domain); **SCF**, ligaza ubikwityny zawierająca białka Skp1, Cullin-1 i F-box (Skp-Cullin-F-box); **TAD**, domena transaktywująca (transactivation domain); **TIR**, receptor Toll/IL-1 (Toll/IL-1 receptor); **TLRs**, receptory Toll-podobne (Toll-like receptors); **TNF-α**, czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor-α); **TRAF**, czynnik związany z receptorem TNF (TNF receptor-associated factor); **TRIP**, białko oddziałujące z TRAF (TRAF-interacting protein); **VACV**, wirus krowianki (vaccinia virus); **VACV-WR**, VACV szczep Western Reserve (VACV strain Western Reserve); **VARV**, wirus ospy prawdziwej (variola virus); **vCC-CKBP**, wirusowe białko wiążące chemokiny typu CC (viral CC chemokine--binding protein); **vCD30**, wirusowy receptor CD30 (viral CD30); **vIFN-γR**, wirusowy receptor IFN-γ (viral IFN-γ receptor); **vIL1βR**, wirusowy receptor interleukiny 1β (viral IL-1β receptor); **vTNFR**, wirusowy receptor TNF (viral TNF receptor); **WHO**, Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization)

Piśmiennictwo

1. Aizawa Y., Akita K., Taniai M., Torigoe K., Mori T., Nishida Y., Ushio S., Nukada Y., Tanimoto T., Ikegami H., Ikeda M., Kurimoto M.: Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett.* **445**, 338–342 (1999)
2. Alcamí A., Smith G.L.: A soluble receptor for interleukin-1β encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*, **71**, 153–167 (1992)
3. Alejo A., Saraiva M., Ruiz-Argüello M.B., Viejo-Borbolla A., de Marco M.F., Salguero F.J., Alcami A.: A method for the generation of ectromelia virus (ECTV) recombinants: *in vivo* analysis of ECTV vCD30 deletion mutants. *PLoS One*, **4**, e5175 (2009)
4. Alzhanova D., Früh K.: Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect.* **12**, 900–909 (2010)
5. Andrewes C.H., Elford W.J.: Infectious ectromelia; experiments on interference and immunization. *Br. J. Exp. Pathol.* **28**, 278–285 (1947)
6. Barnes P.J., Karin M.: Nuclear factor-κB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066–1071 (1997)
7. Barry M., Wasilenko S.T., Stewart T.L., Taylor J.M.: Apoptosis regulator genes encoded by poxviruses. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **36**, 19–37 (2004)
8. Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S., Baltimore D.: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-κB. *Nature*, **376**, 167–170 (1995)
9. Berche P.: The threat of smallpox and bioterrorism. *Trends Microbiol.* **9**, 15–18 (2001)
10. Bergqvist S., Ghosh G., Komives E.A.: The IκBα/NF-κB complex has two hot spots, one at either end of the interface. *Protein Sci.* **17**, 2051–2058 (2008)
11. Biswas P., Smith C.A., Goletti D., Hardy E.C., Jackson R.W., Fauci A.S.: Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity*, **2**, 587–596 (1995)
12. Born T.L., Morrison L.A., Esteban D.J., VandenBos T., Thebeau L.G., Chen N., Spriggs M.K., Sims J.E., Buller R.M.L.: A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J. Immunol.* **164**, 3246–3254 (2000)
13. Bowie A., Kiss-Toth E., Symons J.A., Smith G.L., Dower S.K., O'Neill L.A.J.: A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10162–10167 (2000)
14. Brick D.J., Burke R.D., Minkley A.A., Upton C.: Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J. Gen. Virol.* **81**, 1087–1097 (2000)
15. Brivanlou A.H., Darnell J.E. Jr.: Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**, 813–818 (2002)
16. Buller R.M.L., Owens G., Schriewer J., Melman L., Beadle J.R., Hostetler K.Y.: Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology*, **318**, 474–481 (2004)
17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Laboratory-acquired vaccinia exposures and infections-United States, 2005–2007. *MMWR*, **57**, 401–404 (2008)
18. Chang S.J., Hsiao J.C., Sonnberg S., Chiang C.T., Yang M.H., Tzou D.L., Mercer A.A., Chang W.: Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF-κB activation by tumor necrosis factor α but is independent of its host range function. *J. Virol.* **83**, 4140–4152 (2009)
19. Chaundhri G., Panchanathan V., Buller R.M.L., van den Eertwegh A.J., Claassen E., Zhou J., de Chazal R., Laman J.D., Karupiah G.: Polarized type 1 cytokine response and cell--mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9057–9062 (2004)
20. Chen F., Castranova V., Shi X., Demers L.M.: New insights into the role of nuclear factor-κB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* **45**, 7–17 (1999)
21. Chen N., Buller R.M.L., Wall E.M., Upton C.: Analysis of host response modifier ORFs of ectromelia virus, the causative agent of mousepox. *Virus Res.* **66**, 155–173 (2000)
22. Chen R.A.J., Jacobs N., Smith G.L.: Vaccinia virus strain Western Reserve protein B14 is an intracellular virulence factor. *J. Gen. Virol.* **87**, 1451–1458 (2006)

23. Chen R.A.J., Ryzhakov G., Cooray S., Randow F., Smith G.L.: Inhibition of IκB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS Pathog.* **4**, e22 (2008)
24. Chu W.M., Ostertag D., Li Z.W., Chang L., Chen Y., Hu Y., Williams B., Perrault J., Karin M.: JNK2 and IKKβ are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*, **11**, 721–731 (1999)
25. Dejardin E.: The alternative NF-κB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1161–1179 (2006)
26. EMEA: Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccines against smallpox (2002)
27. Espinosa L., Bigas A., Mulero M.C.: Alternative nuclear functions for NF-κB family members. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 446–459 (2011)
28. Esposito J.J., Knight J.C.: Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, **143**, 230–251 (1985)
29. Essbauer S., Pfeffer M., Meyer H.: Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **140**, 229–236 (2010)
30. Esteban D.J., Buller R.M.L.: *Ectromelia virus*: the causative agent of mousepox. *J. Gen. Virol.* **86**, 2645–2659 (2005)
31. Esteban D.J., Nuara A.A., Buller R.M.L.: Interleukin-18 and glycosaminoglycan binding by a protein encoded by *Variola virus*. *J.Gen. Virol.* **85**, 1291–1299 (2004)
32. Fagan-Garcia K., Barry M.: A vaccinia virus deletion mutant reveals the presence of additional inhibitors of NF-κB. *J. Virol.* **85**, 883–894 (2011)
33. Fenner F., Mousepox (w) The Mouse in Biomedical Research, red. H.L. Foster, J.D. Small, J.G. Fox, Academic Press, New York, 1982, t. II, s. 209–230.
34. Fenner F.: Mousepox (infectious ectromelia): past, present, and future. *Lab. Anim. Sci.* **31**, 553–559 (1981)
35. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Tournier J.N., Garin D., Crance J.M.: Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine*, **25**, 4809–4817 (2007)
36. Gedey R., Jin X.L., Hinthong O., Shisler J.L.: Poxviral regulation of the host NF-κB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-κB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J. Virol.* **80**, 8676–8685 (2006)
37. Ghosh S., Karin M.: Missing pieces in the NF-κB puzzle. *Cell*, **109**, 81–96 (2002)
38. Gil J., Alcamí J., Esteban M.: Induction of apoptosis by double--stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-κB. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4653–4663 (1999)
39. Gilmore T.D., Ip Y.T., Signal transduction pathways in development and immunity: NFκB/Rel pathways (w) eLS, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009
40. Gubser C., Hué S., Kellam P., Smith G.L.: Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* **85**, 105–117 (2004)
41. Guerin J.L., Gelfi J., Boullier S., Delverdier M., Bellanger F.A., Bertagnoli S., Drexler I., Sutter G., Messud-Petit F.: Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J. Virol.* **76**, 2912–2923 (2002)
42. Guerra S., López-Fernández L.A., Conde R., Pascual-Montano A., Harshman K., Esteban M.: Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J. Virol.* **78**, 5820–5834 (2004)
43. Hinthong O., Jin H.L., Shisler J.L.: Characterization of wild-type and mutant vaccinia virus M2L proteins' abilities to localize to the endoplasmic reticulum and to inhibit NF-κB activation during infection. *Virology*, **373**, 248–262 (2008)
44. Hiscott J., Kwon H., Génin P.: Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-κB pathway. *J. Clin. Invest.* **107**, 143–151 (2001)
45. Hu F.Q., Smith C.A., Pickup D.J.: Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology*, **204**, 343–356 (1994)
46. Huang T.T., Miyamoto S.: Postrepression activation of NF-κB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IκBα. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4737–4747 (2001)
47. Johnston J.B., McFadden G.: Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J. Virol.* **77**, 6093–6100 (2003)
48. Kaufman R.J.: Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for and old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11693–11695 (1999)
49. Krzyżowska M., Polańczyk M., Baś M., Cymerys J., Schollenberger A., Chiodi F., Niemiałtowski M.: Mousepox conjunctivitis: the role of Fas/FasL mediated apoptosis of epithelial cells in virus dissemination. *J. Gen. Virol.* **86**, 2007–2018 (2005)
50. Kumar A., Haque J., Lacoste J., Hiscott J., Williams B.R.: Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-κB by phosphorylating IκB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6288–6292 (1994)
51. Lawrence T.: The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651 (2009)
52. Lefkowitz E.J., Wang C., Upton C.: Poxviruses: past, present, and future. *Virus Res.* **117**, 105–118 (2006)
53. Loparev V.N., Parsons J.M., Knight J.C., Panus J.F., Ray C.A., Buller R.M.L., Pickup D.J., Esposito J.J.: A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3786–3791 (1998)
54. Lynch H.E., Ray C.A., Oie K.L., Pollara J.J., Petty I.T.D., Sadler A.J., Williams B.R.G., Pickup D.J.: Modified vaccinia virus Ankara can activate NF-κB transcription factors through a double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-dependent pathway during the early phase of virus replication. *Virology*, **391**, 177–186 (2009)
55. Mahy B.W.J., A dictionary of virology. Academic Press. San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 2001, s. 314.
56. Mansouri M., Bartee E., Gouveia K., Hovey Nerenberg B.T., Barrett J., Thomas L., Thomas G., McFadden G., Fruh K.: The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J. Virol.* **77**, 1427–1440 (2003)
57. Martin S., Shisler J.L.: Early viral protein synthesis is necessary for NF-κB activation in modified vaccinia Ankara (MVA)--infected 293T fibroblast cells. *Virology*, **390**, 298–306 (2009)
58. Mogensen T.H.: Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240–273 (2009)
59. Mohamed M.R., Rahman M.M., Lanchbury J.S., Shattuck D., Neff C., Dufford M., van Buuren N., Fagan K., Barry M., Smith S., Damon I., McFadden G.: Proteomic screening of variola virus reveals a unique NF-κB inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **106**, 9045–9050 (2009)
60. Mohamed M.R., McFadden G.: NFκB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle*, **8**, 3125–3132 (2009)
61. Mohamed M.R., Rahman M.M., Rice A., Moyer R.W., Werden S.J., McFadden G.: Cowpox virus expresses a novel ankyrin repeat NF-κB inhibitor that controls inflammatory cell influx into virus-infected tissues and is critical for virus pathogenesis. *J. Virol.* **83**, 9223–9236 (2009)

62. Moss B., Poxviridae: the viruses and their replication (w) Fields virology, red. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2007, t. 2, s. 2905–2946.
63. Navarini A.A., Krzyżowska M., Lang K.S., Horvath E., Hengartner H., Niemiałtowski M.G., Zinkernagel R.M.: Long lasting immunity by early infection of maternal-antibody protected infants. *Eur. J. Immunol.* **39,** 3052–3065 (2009)
64. Niemiałtowski M., Szulc L., Boratyńska A., Martyniszyn L., Struzik J., Karandys J.: Ospa prawdziwa: patrząc wstecz do Edwarda Jennera, a nawet troche dalej. *Post. Mikrobiol.* **48**, 289–298 (2009)
65. Oie K.L., Pickup D.J.: Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-κB activation. *Virology*, **288**, 175–187 (2001)
66. Pahl H.L.: Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853–6866 (1999)
67. Panus J.F., Smith C.A., Ray C.A., Smith T.D., Patel D.D., Pickup D.J.: Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8348–8353 (2002)
68. PBR (online). http://www.poxvirus.org/viruses.asp (06.06.2012 r.)
69. Perkins N.D.: The Rel/NF-κB family: friend and foe. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 434–440 (2000)
70. Rajagopal N.A., Hu S., Lokensgard J.R.: Inhibition of Toll-like receptor signaling in primary murine microglia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **3**, 5–11 (2008)
71. Ray C.A., Black R.A., Kronheim S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R., Salvesen G.S., Pickup D.J.: Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1β converting enzyme. *Cell*, **69**, 597–604 (1992)
72. Ribas G., Rivera J., Saraiva M., Campbell R.D., Alcami A.: Genetic variability of immunomodulatory genes in ectromelia virus isolates detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Virol.* **77**, 10139–10146 (2003)
73. Rupec R.A., Poujol D., Grosgeorge J., Carle G.F., Livolsi A., Peyron J.F., Schmid R.M., Baeuerle P.A., Messer G.: Structural analysis, expression, and chromosomal localization of the mouse *ikba* gene. *Immunogenetics*, **49**, 395–403 (1999)
74. Saraiva M., Alcami A.: CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J. Virol.* **75**, 226–233 (2001)
75. Saraiva M., Smith P., Fallon P.G., Alcami A.: Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *J. Exp. Med.* **196**, 829–839 (2002)
76. Schmitz M.L., Baeuerle P.A.: The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-κB. *EMBO J.* **10**, 3805–3817 (1991)
77. Schulze C., Alex M., Schirrmeier H., Hlinak A., Engelhardt A., Koschinski B., Beyreiss B., Hoffmann M., Czerny C.P.: Generalized fatal Cowpox virus infection in a cat with transmission to a human contact case. *Zoonoses Public Health*, **54**, 31–37 (2007)
78. Sen R., Baltimore D.: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705–716 (1986)
79. Shchelkunov S.N.: Immunomodulatory proteins of orthopoxviruses. *Mol. Biol.* **37**, 37–48 (2003)
80. Shisler J.L., Jin X.L.: The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-κB activation by preventing IκBα degradation. *J. Virol.* **78**, 3553–3560 (2004)
81. Silva D.C., Moreira-Silva E.A., Gomes Jde A., Fonseca F.G., Correa-Oliveira R.: Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia virus infections. *Braz. J. Infect. Dis.* **14**, 129–134 (2010)
82. Smith C.A., Hu F.Q., Smith T.D., Richards C.L., Smolak P., Goodwin R.G., Pickup D.J.: Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LTα. *Virology*, **223**, 132–147 (1996)
83. Smith V.P., Alcami A.: Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus. *J. Virol.* **74**, 8460–8471 (2000)
84. Smith V.P., Alcami A.: Inhibition of interferons by ectromelia virus. *J. Virol.* **76**, 1124–1134 (2002)
85. Smith V.P., Bryant N.A., Alcamí A.: Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *J. Gen. Virol.* **81**, 1223–1230 (2000)
86. Spohr Cespedes I., Toka F.N., Schollenberger A., Gieryńska M., Niemiałtowski M.: Pathogenesis of mousepox in H-2^d mice: evidence for MHC class I-restricted CD8$^+$ and MHC class II--restricted CD4$^+$ CTL antiviral activity in the lymph nodes, spleen and skin, but not in the conjunctivae. *Microbes Infect.* **3**, 1063–1072 (2001)
87. Spriggs M.K., Hruby D.E., Maliszewski C.R., Pickup D.J., Sims J.E., Buller R.M.L., VanSlyke J.: Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell*, **71**, 145–152 (1992)
88. Steinberg A.D.: Recent worldwide research on animal pox viruses. Open Source Center, MITRE Corp., January 2008
89. Sutter G., Staib C.: Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **3,** 263–271 (2003)
90. Symons J.A., Adams E., Tscharke D.C., Reading P.C., Waldman H., Smith G.L.: The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *J. Gen. Virol.* **83**, 2833–2844 (2002)
91. Szulc L., Boratynska A., Martyniszyn L., Niemialtowski M.G.: Antigen presenting and effector cell cluster formation in BALB/c mice during mousepox: model studies. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1817–1828 (2010)
92. Turner S.J., Silke J., Kenshole B., Ruby J.: Characterization of the ectromelia virus serpin, SPI-2. *J. Gen.Virol.* **81**, 2425–2430 (2000)
93. Willis K.L., Langland J.O., Shisler J.L.: Viral dsRNAs from vaccinia virus early or intermediate gene transcripts possess PKR activating function, resulting in NF-κB activation, when the K1 protein is absent or mutated. *J. Biol. Chem.* **286,** 7765–7778 (2011)
94. World Health Organization, The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. History of International Public Health No. 4. Geneva, World Health Organization, 1980.

Pracę wykonano w ramach grantu promotorskiego N N308 573740 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie. Justyna Struzik – Doktorantka z dziennego studium doktoranckiego „Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych" przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie (kierownik studium i promotor: prof. dr hab. Marek Niemiałtowski)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 167–176
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNE ŹRÓDŁA BARWNIKÓW W TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI

Izabela Stolarzewicz[1]*, Agata Kapturowska[1], Ewa Białecka-Florjańczyk[1]

[1] Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Barwniki syntetyczne. 3. Barwniki naturalne. 3.1. Barwniki identyczne z naturalnymi otrzymywane na drodze syntezy chemicznej. 4. Mikrobiologiczna produkcja barwników. 4.1. Grzyby jako potencjalne źródło barwników w technologii żywności. 4.2. Mikroalgi w produkcji barwników. 4.3. Bakterie i drożdże jako producenci związków o charakterze barwników. 5. Podsumowanie

Microbiological sources of colorants in food technology

Abstract: Recent years have brought intensive discussions concerning harmful influence of synthetic colorants used in food industry. It has focused the interest of both the food producers and the consumers on natural dyes. The aim of this review is to present novel methods of biosynthesis of natural colorants. The scope of the paper is not limited to those substances which are currently in use, but includes also some other compounds potentially useful in such applications are described. New sources of food colorants has been discovered among such organisms as algae (*Dunaliella* producing β-carotene), fungi (poliketides pigments), yeast (*Ashbya gossypii* producing riboflavin), bacteria. The highest expectations are connected with carotenoids, which are currently being intensively investigated. Their structural diversity opens up a wide range of potential new colorants. The most important method of their modification is cloning of *crt* genes and their expression in *E. coli* cells.

1. Introduction. 2. Synthetic colorants. 3. Natural colorants. 3.1. Nature-identical colorants produced by chemical synthesis. 4. Microbiological production of colorants. 4.1. Fungi as a potential source of colorants in food technology. 4.2. Microalgaes in the production of colorants. 4.3. Bacteria and yeast as producers of coloring compounds. 5. Conclusion

Słowa kluczowe: barwniki, źródła mikrobiologiczne, modyfikacje genetyczne
Key words: colorants, microbial sources, genetic modifications

1. Wstęp

Rozwój przemysłu spożywczego, nowych źródeł i sposobów pozyskiwania surowców, a także wzrost świadomości społeczeństwa powoduje, że oczekiwania konsumentów wobec żywności ulegają ciągłym zmianom. W ostatnich latach rozgorzała dyskusja nad szkodliwością, stosowanych w żywności sztucznych barwników, co przyczyniło się do gwałtownego wzrostu zainteresowania zarówno producentów żywności jak i konsumentów barwnikami naturalnymi. Kolory pełnią podstawową rolę w identyfikacji produktów spożywczych oraz są czynnikiem podwyższającym ich walory smakowe. Zatem barwienie żywności jest ważnym procesem mającym na celu:

- odtworzenie pierwotnej barwy utraconej w wyniku przetwarzania,
- nadanie barwy produktom spożywczym zazwyczaj naturalnie bezbarwnym lub czasowo bezbarwnym,
- wzmocnienie istniejącej barwy,
- podkreślenie aromatu (smaku) środka spożywczego związanego z konkretną barwą, co czyni go łatwiejszym do rozpoznania.

Barwniki spożywcze możemy podzielić na barwniki pochodzenia naturalnego oraz syntetyczne lub na barwniki rozpuszczalne w wodzie (antocyjany, betacyjany i chlorofile) oraz rozpuszczalne w tłuszczach i rozpuszczalnikach organicznych (karotenoidy). Barwniki naturalne otrzymywane są na drodze wieloetapowego procesu ekstrakcji z materiału biologicznego, którego źródłem mogą być rośliny lub owady, natomiast te identyczne z naturalnymi pozyskuje się na drodze syntezy chemicznej.

Dotychczas Rada Unii Europejskiej (Council of European Union) zatwierdziła 43 barwniki stosowane jako dodatki do żywności, w tym 16 naturalnych, którym zostały wyznaczone identyfikatory numeryczne z literą E [14]. Jednak w 2007 roku Parlament Europejski przyjął zapis zaostrzający możliwość zastosowania niektórych barwników syntetycznych, a mianowicie tych oznaczonych numerami 102 (tetrazyna), 104 (żółcień chinolinowa), 110 (żółcień pomarańczowa), 122 (azorubina), 124 (czerwień koszenilowa) i 129 (czerwień allurowa). Przyczyną takich zaostrzeń były wyniki badań naukowych dotyczących potencjalnego niekorzystnego wpływu wymienionych dodatków na zdrowie człowieka, w tym wzrost ryzyka występowania alergii, nowotworów czy nadpobudliwości u dzieci. Wielu producentów żywności, między innymi Heinz, McDonald's czy Tesco dobrowolnie zrezygnowały ze stosowania tych substancji.

* Autor korespondencyjny: Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa; tel: (+ 48 22) 59 37 621; e-mail: izabela_stolarzewicz@sggw.pl

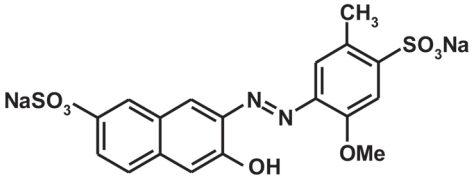
Obecnie barwniki naturalne stanowią 31% rynku substancji barwiących [44]. W związku z wycofywaniem barwników sztucznych przewiduje się, że ich produkcja będzie wzrastała rocznie jedynie o 3–5%, zaś produkcja barwników naturalnych o 5–10% [43].

Z uwagi na niską wydajność procesu ekstrakcji i małą stabilność dotychczas otrzymywanych barwników naturalnych poszukuje się nowych możliwości pozyskiwania związków mogących pełnić rolę substancji barwiących żywność. Pomimo dużego zainteresowania naturalnymi pigmentami nasza wiedza o ich występowaniu, możliwościach wykorzystania i właściwościach jest ograniczona. Wiele źródeł nowych barwników kryje się w bioróżnorodności świata roślin i mikroorganizmów występujących w niezbadanych dotychczas ekosystemach, zarówno lądowych jak i wodnych.

W pracy przedstawiono potencjalne mikrobiologiczne źródła barwników mogących znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym.

2. Barwniki syntetyczne

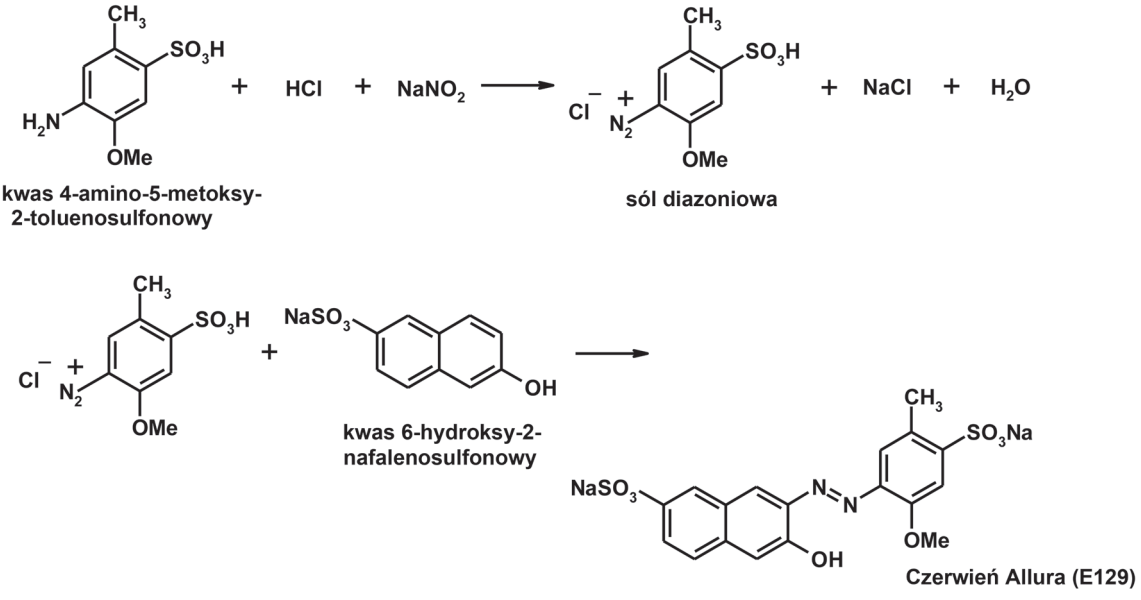
Syntetyczne związki barwiące mogą mieć dwojaki charakter w zależności od ich budowy i właściwości chemicznych, a więc mogą zaliczać się do grupy związków organicznych lub nieorganicznych. Dopuszczone do stosowania organiczne barwniki syntetyczne to przede wszystkim związki azowe o wzorze ogólnym $R_1N{=}NR_2$, np. Czerwień Allura (E129) (rys. 1). Barwniki te posiadają wiele zalet w porównaniu z ich naturalnymi zamiennikami, cechuje je mianowicie standardowa moc barwienia definiowana jako zależność między ilością dodanej substancji barwiącej a uzyskanym odcieniem. Są czystymi, jednorodnymi związkami chemicznymi, posiadającymi większą odporność na warunki środowiska, a ich formy handlowe są łatwiejsze do stosowania w produkcji żywności. Ponadto barwniki syntetyczne są tańsze w porównaniu do ich naturalnych odpowiedników. Z drugiej strony stosowanie tych związków budzi wiele kontrowersji z powodu ich domniemanej szkodliwości dla zdrowia człowieka [30].



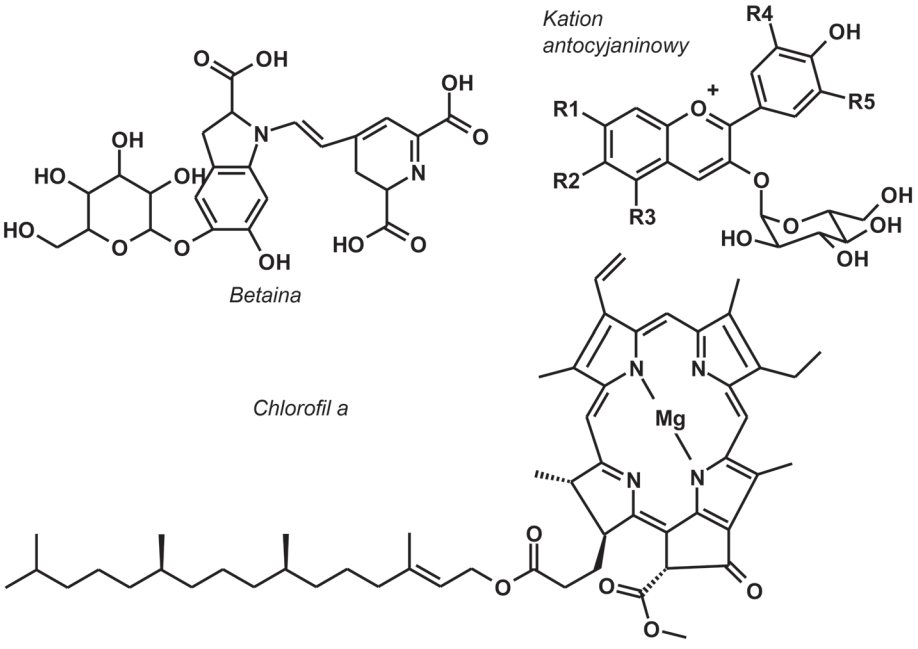
Rys. 1. Syntetyczny barwnik azowy – Czerwień Allura (E129)

Barwniki azowe powstają w reakcji sprzęgania soli diazoniowych z pochodnymi fenolu lub amin aromatycznych. Ponieważ oba składniki mogą być znacząco modyfikowane, w rezultacie można uzyskać ogromną liczbę barwników, szczególnie wtedy, gdy cząsteczki wyjściowe są łatwo dostępne i tanie. Synteza barwników azowych jest prowadzona w niskich temperaturach, a co za tym idzie nie wymaga dostarczania energii. Ponadto szkodliwy wpływ procesu na środowisko jest niewielki, ponieważ wszystkie reakcje zachodzą w środowisku wodnym. Dlatego z uwagi na wymienione powyżej czynniki koszt produkcji tej grupy barwników syntetycznych jest stosunkowo niewielki [45]. Pierwszym otrzymanym w ten sposób barwnikiem w 1958 roku była żółcień anilinowa, natomiast przykładem syntezy związku używanego do barwienia żywności jest reakcja otrzymywania Czerwieni Allura (E129) (związek monoazowy niesymetryczny) [7] (rys. 2).

Barwniki nieorganiczne odgrywają stosunkowo niewielką rolę w barwieniu żywności. Najczęściej sto-



Rys. 2. Synteza Czerwieni Allura



Rys. 3. Przykłady barwników naturalnych

sowane są metale, których atrakcyjne właściwości kolorystyczne sprawiają, iż wykorzystywane są one głównie do barwienia powierzchniowego [30].

3. Barwniki naturalne

Barwniki naturalne uzyskuje się z materiału biologicznego pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i mikrobiologicznego oraz z minerałów (rys. 3). W niniejszej pracy zostaną przedstawione barwniki, których źródło stanowią mikroorganizmy.

Związki barwiące pochodzenia naturalnego w przeciwieństwie do syntetycznych barwników azowych mają mniej intensywną barwę, a co za tym idzie mają mniejszą zdolność barwienia. Ponadto są znacznie bardziej wrażliwe na działanie czynników utleniających, podwyższonej temperatury oraz zmian pH. Pomimo tych wad są pożądane przez producentów żywności, ponieważ budzą zaufanie konsumentów w odniesieniu do bezpieczeństwa ich stosowania. W przemyśle spożywczym barwniki naturalne stosowane są w postaci ekstraktów i koncentratów otrzymanych z surowców naturalnych pochodzenia roślinnego, a w zależności od ich struktury, można je podzielić na następujące grupy:

- izoprenoidowe – karotenoidy,
- porfirynowe – chlorofile,
- flawonoidowe – antocyjany,
- betalainowe – betaniny i betaksantyny,
- chinoidowe – koszenila,
- inne barwniki – ryboflawina, kurkumina.

Ekstrakcja substancji naturalnych, w tym barwników, polega na ich izolacji z komórek, tkanek bądź organów roślinnych (korzenie, rozłogi, kwiaty, owoce) oraz przeprowadzeniu do roztworu [14]. Wydajność takiego procesu oscyluje najczęściej na poziomie 20%.

W przypadku barwników związanych z procesem fotosyntezy zlokalizowanych głównie w chloroplastach takich jak np. chlorofil, konieczne jest zniszczenie struktur komórkowych przed rozpoczęciem procesu ekstrakcji. Dezintegrację ściany komórkowej przeprowadza się najczęściej metodami fizycznymi (homogenizacja, zmiany temperatury, sonifikacja) i/lub chemicznymi (działanie rozpuszczalnikami lub enzymami). Otrzymane ekstrakty są zagęszczane i oczyszczane odpowiednio dobraną metodą [14].

3.1. Naturalne barwniki otrzymywane na drodze syntezy chemicznej

Wzrost świadomości proekologicznej społeczeństwa powoduje, iż przemysł w tym także przemysł spożywczy poszukuje nowych przyjaznych środowisku źródeł i sposobów pozyskiwania surowców.

Jednym z najczęściej otrzymywanych na drodze syntezy chemicznej barwnikiem naturalnym jest β- karoten. Obok β- karotenu syntetyzuje się również jego pochodne m.in. kantaksantynę (ciemnoczerwona), β-apo-8'-karotenal i kwas β- apo-8'-karotenowy oraz jego estry: metylowy i etylowy (dające kolor od żółtego do pomarańczowego w zależności od stężenia związku). Te syntetyczne karotenoidy, przygotowane w odpowiedniej formie aplikacyjnej w celu uzyskania pożądanej barwy oraz satysfakcjonującej stabilności, mają szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Karotenoidy otrzymywane są w postaci słabo rozpuszczalnych kryształów, zaś preparaty użytkowe przyjmują postać koncentratów olejowych lub zostają zdyspergowane w wodzie. Formy olejowe dodawane są do takich artykułów jak jaja (barwnik dodawany jest do pasz dla kur), pieczywo oraz artykuły mleczne, natomiast barwniki zdyspergowane w wodzie wykorzystuje się do barwienia napoi bezalkoholowych [7].

4. Mikrobiologiczna produkcja pigmentów

Mikroorganizmy produkują szereg związków o właściwościach barwiących, jednakże z powodu trudności związanych z wprowadzeniem takich substancji na rynek wynikających między innymi z możliwości skażenia mikotoksynami, tylko niewielką liczbę pigmentów pochodzenia mikrobiologicznego produkuje się na skalę przemysłową.

Najstarszym źródłem barwników produkowanych przez grzyby i stosowanych przez człowieka jest red koji (angkak), ryż fermentowany przez rodzaj *Monascus*, tradycyjnie używany w Azji od wieków do barwienia czerwonego ryżowego wina, czerwonego sera sojowego, mięsa czy też produktów rybnych. Ten od dawna używany w krajach azjatyckich pigment jest ciągle niedopuszczony do produkcji w USA z uwagi na mikotoksyny, jakie mogą produkować niektóre gatunki pleśni z rodzaju *Monascus*.

Pierwszym europejskim sukcesem w dziedzinie mikrobiologicznej produkcji pigmentów było wykorzystanie pleśni z rodzaju *Blakeslea* w produkcji β-karotenu. Europejska Dyrekcja Generalna do spraw Zdrowia i Ochrony Konsumentów zatwierdziła β-karoten produkowany w ten sposób jako identyczny z tym syntetyzowanym chemicznie, a tym samym dopuszczalny do barwienia żywności. Gatunek *Blakeslea trispora* jest obecnie wykorzystywany również do produkcji likopenu [9].

Komercyjna produkcja likopenu, czyli pomarańczowo-czerwonego barwnika (E160d), opiera się na syntezie chemicznej (p. 3.1) lub ekstrakcji z naturalnych źródeł np. pomidorów (*Lycopersicum esculentum*). Z uwagi na rosnące znaczenia tego związku oraz fakt, że rośliny i algi produkują jedynie mieszanki karotenoidów, a nie pojedynczy barwnik, zostały podjęte próby znalezienia alternatywnych dróg produkcji, gwarantujących otrzymywanie z dużą wydajnością czystego likopenu. Szlak biosyntezy β-karotenu, w którym produktem przejściowym jest likopen, został zbadany i opisany w komórkach *Phaffia balesleeanus*, *Mucor circinelloides* i *Blakeslea trispora*. Produkcja wspomnianego barwnika u wyżej wymienionych gatunków grzybów odbywa się dzięki wyeliminowaniu aktywności genu cyklazy likopenu lub chemicznemu jej zahamowaniu poprzez dodatek do podłoża hodowlanego amin trzeciorzędowych, aminometylopirydyny lub heterocyklicznych związków azotowych, takich jak np. imidazol, pirydyna. U *B. trispora* wydajność syntezy likopenu sięga ok. 5% suchej masy [20].

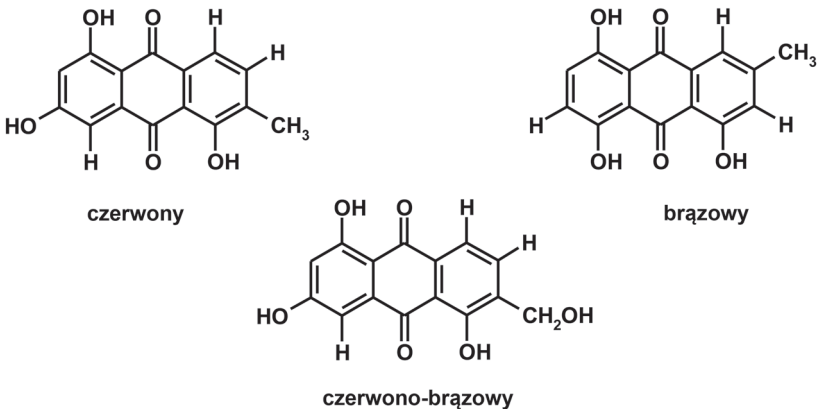
Kolejnym przykładem syntezy mikrobiologicznej jest produkcja żółtego barwnika – ryboflawiny (witaminy) przez drożdże *Eremothecium ashbyii* i *Ashbya gossypi,* które należą do tzw. „mocnych" producentów (syntezują 1 g barwnika/dm^3 podłoża hodowlanego) oraz przez drożdże *Candida guilliermudii* lub *Debaryomyces subglobosus* nazywane „umiarkowanymi" producentami tej witaminy (ponad 600 mg/dm^3 podłoża hodowlanego). Gatunkiem bakterii produkującym ryboflawinę z niewielką wydajnością jest *Clostridium acetobutylicum* (100 mg/dm^3 podłoża hodowlanego) [9].

Właśnie z produkcją mikrobiologiczną, a co za tym idzie z pozyskiwaniem substancji barwiących w hodowli takich mikroorganizmów jak bakterie, grzyby czy też algi, wielu naukowców wiąże nadzieje na otrzymywanie barwników do żywności konkurencyjnych w stosunku do barwników sztucznych zarówno pod względem ich właściwości jak i ceny.

4.1. Grzyby jako potencjalne źródło barwników w technologii żywności

Produkcja wielu obecnie akceptowanych barwników żywności wiąże się z kilkoma ograniczeniami, do których należą m.in. zależność producenta od zapasów surowca czy też zmienność metod ekstrakcji pigmentów ze względu na zróżnicowanie składu surowców wykorzystywanych do ekstrakcji substancji barwiących. Przeprowadzone ostatnio autoryzacje produkowanych przez grzyby barwników stosowanych w żywności zdopingowały naukowców do badań nad chemiczną i biologiczną różnorodnością świata grzybów w celu pozyskania nowych pigmentów dla przemysłu. Badania te wymagają stosowania metod chemotaksonomicznych oraz wiedzy *a priori* dotyczącej metabolizmu tych organizmów [22].

Grzyby charakteryzują się dużą wydajnością produkcji biomasy, a ich wtórne metabolity wykazują małą wrażliwość na ciepło i zmienne pH. Dlatego właśnie te organizmy wydają się być warte dalszych badań jako alternatywne źródła naturalnych barwników [22]. Niektóre pigmenty pozyskiwane z komórek grzybów strzępkowych były znane już od dawna i wykorzystywane jako narzędzie taksonomiczne w identyfikacji gatunków. Nie badano ich jednak pod kątem potencjalnego zastosowania w technologii żywności [28]. Znaczna część wcześniejszych prac dotyczących otrzymywania barwników pochodzenia mikrobiologicznego skupiała się na związkach karotenoidowych, których to produkcja została już skomercjalizowana [1].

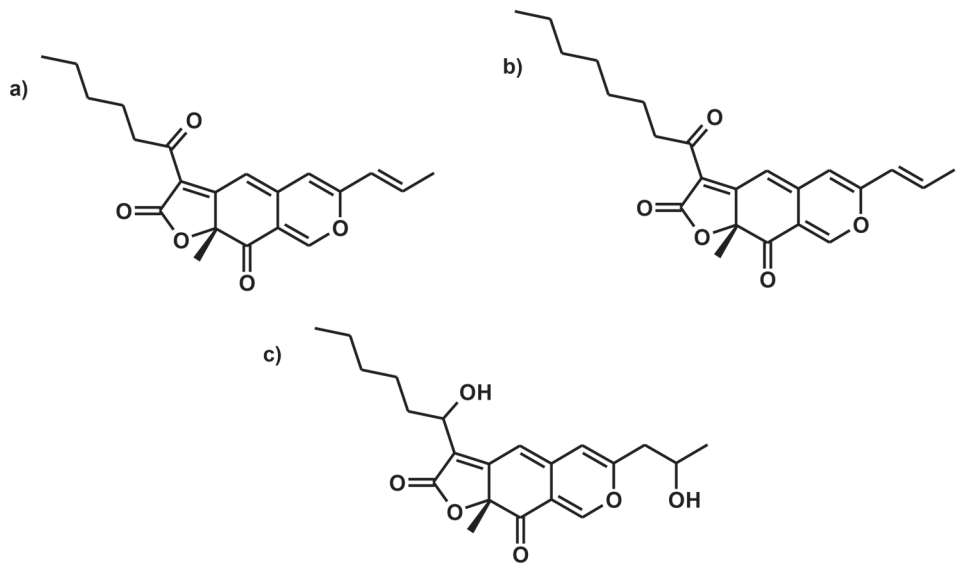


Rys. 4. Barwniki antrachinonowe

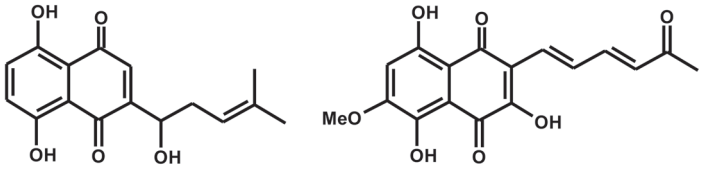
Podobnie jak rośliny, grzyby syntetyzują pigmenty, które w zależności od typu związku pełnią różne funkcje w komórce, począwszy od ochrony przed fotoutlenianiem (karotenoidy) i stresem środowiska (melaniny), a skończywszy na kofaktorach w katalizie enzymatycznej (flawiny) [22].

Pigmenty grzybów wykazują unikatową różnorodność chemiczną i strukturalną połączoną z szerokim zakresem kolorów. Są to między innymi chinony takie jak antrachinony [10] i naftochinony [4,11,18], kompleks dihydroksynaftalenu i melaniny [5] oraz pochodne flawiny takie jak np. ryboflawina [4]. Przykładowe barwniki antrachinononowe produkowane przez *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia lunata* oraz *Drechelera* spp. [24], zostały przedstawione na rysunku 4.

Jednym z najlepiej poznanych grzybów pod kątem produkcji pigmentów jest *Monascus* spp., który wytwarza takie barwne związki jak monaskorubryna i rubropunktatyna (rys. 5 a, b). Oba pigmenty posiadają charakterystyczną strukturę odpowiedzialną za wysokie powinowactwo do pierwszorzędowych grup aminowych, stąd nazywane są aminofilami [17]. W obecności różnych aminokwasów pleśń z rodzaju *Monascus* może produkować pigmenty o barwach od pomarańczowo-żółtej do fioletowo-czerwonej. Obok wymienionej monaskorubraminy i rubropunktaminy ostatnio wyizolowano i opisano trzeci z czerwonych barwników *Monascus* spp. różniący się od pozostałych podstawnikami w pozycji C3 i C9 w ich strukturze chemicznej (rys. 5 c). Nowoodkryty pigment wykazuje właściwości antybakteryjne w szczególności w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, co predestynuje go do zastosowań zarówno w przemyśle spożywczym jak i farmaceutycznym [26]. Niestety w ryżu poddanym fermentacji prowadzonej przez pleśnie *Monascus* spp., wykryto mikotoksynę, cytryninę [19]. Fakt ten ogranicza zastosowanie grzybów z rodzaju *Monascus* jako potencjalnego producenta naturalnych barwników spożywczych i uniemożliwia wprowadzenie takiego produktu na rynek w USA i Europie. Obiecujące mogą być tu



Rys. 5. Pigmenty *Monascus* sp.
a) rubropunktatyna, b) monaskorubryna, c) nowoodkryty barwnik czerwony



Rys. 6. Barwniki naftochinonowe

jednak ostatnie doniesienia świadczące o tym, iż cytrynina jest produkowana tylko przez nieliczne szczepy pleśni z rodzaju *Monascus* [39].

Przykładem barwnika produkowanego przez pleśnie i dopuszczonego do barwienia żywności jest Aprink Red™ produkowany przez ASCOLOR BIOTEC w Czechach. Ten czerwony barwnik jest pozakomórkowym metabolitem z klasy antrachinonów, produkowanym przez *Penicillium oxalicum* var. Armeniach CCM 8242. Po 3–4 dniowej hodowli szczepu pleśni uzyskuje się od 1.5 do 2.0 g/dm^3 tego związku. Barwnik Aprink Red™ jest stabilny w pH wyższym niż 3.5, zaś w pH neutralnym zachowuje kolor nawet po 30 minutach gotowania [46]. Dzięki tym własnościom i pozytywnym wynikom testów toksykologicznych barwnik ten został zatwierdzony przez Komisję Codex Alimentarius. Z kolei pleśnie z gatunku *Penicillium aculeatum* i *P. pinophilum* produkują poliketydowe barwniki azofilne tzw. „*Monascus* – like pigments". Zaletą produkcji tych barwników jest brak toksyczności dla człowieka oraz fakt, iż produkcji tej nie towarzyszy wydzielanie cytryniny i innych mikotoksyn [23].

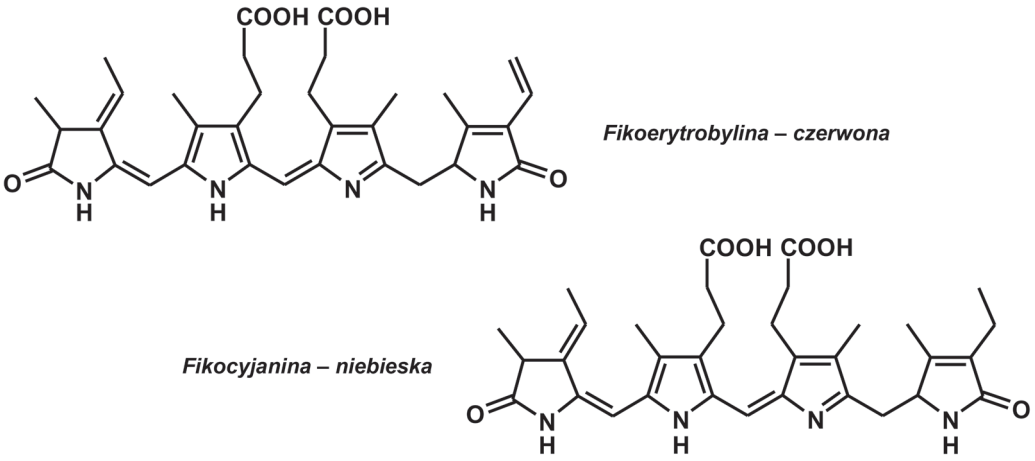
Kolejną grupę pigmentów o znaczeniu komercyjnym stanowią naftochinony (rys. 6), które wykazują szeroką paletę barw oraz są rozpuszczalne w wodzie. Nie wymagają chemicznej modyfikacji ani stosowania nośników i stabilizatorów w celu rozpuszczenia się w żywności, co wynika ze struktury chemicznej zbliżonej do struktury barwników roślinnych czy zwierzęcych. Naftochinony znajdowane są nawet w tak egzotycznych gatunkach pleśni jak *Cordyceps unilateralis*, który jest patogenem mrówek, a jego spory odżywiają się miękkimi tkankami insekta. *C. unilateralis* produkuje pięć czerwonych barwników pozakomórkowych: erytrostominon, deoksyerytrostominon, 4-O-metylostominon, epierytostominol, deoksyerytrostominol i 3,5,8-trihydroksy-6-metoksy-2-(5-oksoheksa-1,3-dienylo)-1,4-naftochinon (3,5,8--TMON), przy czym szczególnym zainteresowaniem cieszy się ten ostatni, ze względu na niską cytotoksyczność oraz intensywny krwisty kolor. Chemiczna struktura naftochinonów produkowanych przez *C. unilateralis* jest podobna do komercyjnie dostępnych czerwonych barwników takich jak szikonina i alkanina (rys. 6), będących odpowiednio metabolitami korzeni roślin *Alkanna tinctoria* i *Lithospermum erythrorhizon*. Szikonina znajduje szerokie zastosowanie począwszy od przemysłu farmaceutycznego jako dodatek o silnym działaniu antybakteryjnym i antymalarycznym poprzez przemysł włókienniczy, kosmetyczny i spożywczy, gdzie może być wykorzystywana w roli barwnika [38].

4.2. Mikroalgi w produkcji barwników

Algi należą do grupy nieunaczynionych organizmów autotroficznych i produkują wiele związków takich jak węglowodany, białka, aminokwasy, witaminy oraz kwasy tłuszczowe [27]. Głównymi pigmentami alg są chlorofile a, b i c, β-karoten, fikocyjanina, ksantofile i fikoerytryna. Wszystkie te pigmenty mają dużą szansę na wykorzystanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Rosnący popyt na barwniki naturalne, które mogą być stosowane w wymienionych gałęziach przemysłu, stał się powodem szerokich badań nad tymi organizmami. W 2007 roku szacowano roczną produkcję alg na 5000 ton suchej masy. Największym zainteresowaniem cieszą się: *Spirulina* produkująca niebieską fikocyjaninę, *Dunalliela* syntetyzująca β-karoten oraz rodzaj *Haematococcus* wytwarzający czerwoną astaksantynę [8,29].

Karotenoidy są obecne w chloroplastach alg w postaci złożonej mieszaniny charakterystycznej dla każdej z ich klas. Na przykład, czerwona alga *Rhodophyta* posiada α i β-karoten oraz ich hydroksylowe pochodne, *Chloromonadophyta* zawiera diadynoksantynę i heteroksantynę, natomiast dla *Chlorophyta* charakterystyczne są acetylenowe pochodne karotenoidów nazywane alloksantyną, monadoksantyną i krokoksantyną. *Spriru-lina* akumuluje β-karoten w stężeniach 0,8–1,0% suchej masy, *Haematococcus* 1,5–3%, a *Dunaliella* nawet 14%, co czyni ją największym jego producentem [8,36].

Do rodzaju *Dunaliella* należą gatunki halotolerancyjne, jednokomórkowe, mające wyjątkową budowę morfologiczną oraz specyficzne właściwości fizjologiczne. Gromadzenie dużych ilości β-karotenu następuje głównie w odpowiedzi na duże natężenie światła, w optymalnych warunkach 25–30 luksów. *Dunaliella salina* potrafi wytworzyć nawet 400 mg β-karotenu/m^2 pola uprawy i może być bezpiecznie używana w przemyśle spożywczym, gdyż posiada status GRAS (ang. Generally Recognized As Safe) [8, 42]. Naturalny β-karoten z alg *Dunaliella* dostępny jest na wielu rynkach pod



Rys. 7. Fikobiliproteiny

trzema postaciami: ekstraktu β-karotenu w postaci emulsji o stężeniach od 1 do 20%, sproszkowanej biomasy alg oraz suszonej biomasy [8, 36].

Czerwona mikroalga z rodzaju *Porphyridium* stanowi źródło związków posiadających wartości odżywcze i terapeutyczne, w tym karotenoidów, głównie zeaksantyny, oraz fluorescencyjnych fikobiliprotein. Fikobiliproteiny należą do pigmentów uczestniczących w fotosyntezie, a gromadzone są w komórkach w postaci fikobilisomów związanych z błoną tylakoidów chloroplastów. Zbudowane są one z chromoforów – bilin, będących podstawionymi tetrapirolami połączonymi z apoproteinami [8] (rys. 7). Czerwona fikobiliproteina – fikoertryna oraz niebieska fikocyjanina są rozpuszczalne w wodzie i mogą pełnić rolę naturalnych barwników w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym [6].

Jeden z gatunków z rodzaju *Porphyridium* jest źródłem fluorescencyjnych różowych pigmentów należących do fikobiliprotein, a mianowicie B-fikoerytryny i b-fikoerytryny. Ta różowoczerwona fikoerytryna może być stosowana do nadawania barwy wyrobom cukierniczym, żelatynowym deserom i produktom mlecznym. Ilość wymagana do zabarwienia 1 kg różnych artykułów waha się od 50 do 100 mg/kg. Kolor tego barwnika jest stabilny w 60°C przez 30 minut i posiada długi czas trwania w pH 6–7. Okazał się on także bardzo stabilny w suchych preparatach przechowywanych w warunkach niskiej wilgotności. Oprócz właściwości barwiących, czerwona fikoerytryna wykazuje żółtą fluorescencję, co daje możliwość użycia jej w specjalnych produktach żywnościowych, między innymi w przeźroczystych lizakach, cukierkach, napojach bezalkoholowych i alkoholowych. Omawiany barwnik nie jest jeszcze stosowany w przemyśle spożywczym, pomimo że badania prowadzone na szczurach karmionych suchą masą alg *Porphyridium* nie ujawniły żadnego negatywnego wpływu na ich wzrost czy też histologię [8].

Źródłem niebieskiego barwnika zwanego Marine blue jest mikroalga *Porphyridium aerugineum*. Ten gatunek różni się od innych czerwonych mikroalg brakiem czerwonej fikoerytryny, ekstrakt z komórek *P. aerugineum* jest niebieski [13]. *P. aerugineum* to alga jednokomórkowa, uprawiana w sztucznym lub w słonecznym świetle, w świeżej wodzie bogatej w dwutlenek węgla. Podczas badań nad optymalizacją procesu produkcji wymienionej wyżej niebieskiej fikocyjaniny udało się uzyskać wydajność wynoszącą ponad 60% suchej masy, zaś ilość wymagana do zabarwienia 1 litra napoju wynosiła 140–180 mg. Zaletę pigmentu produkowanego przez *P. aerugineum* stanowi stabilność wobec zmiennego pH oraz światła, natomiast wadę jego termowrażliwość. W pH 4–5 barwnik ten cechuje się stabilnością w temperaturze 60°C przez 40 minut, co jest istotne dla wykorzystania tego związku w przetwórstwie spożywczym. Pomimo swoich właściwości nie produkuje się go na skalę przemysłową, z uwagi na trwające jeszcze testy toksykologiczne [8].

4.3. Bakterie i drożdże jako producenci związków o charakterze barwników

Spośród mikrobiologicznych źródeł barwników bakterie i drożdże cieszą się mniejszym zainteresowaniem naukowców jako potencjalni producenci substancji wykorzystywanych do barwienia żywności w porównaniu z grzybami i algami. Jednak i w tej grupie mikroorganizmów znajduje się wiele gatunków zdolnych do produkcji pigmentów, które mogą pełnić rolę suplementów diety zarówno zwierząt jak i ludzi. W królestwie bakterii gatunkami zdolnymi do syntezy barwników są między innymi *Chromobacterium violaceum,* produkujący wiolacynę (o barwie purpurowo-fioletowej), *Flavobacterium* sp., który produkuje żółtą zeaksantynę z wydajnością do 190 mg/dm^3 podłoża hodowlanego [9] czy *Agrobacterium aurantiacum* wytwarzający różowoczerwoną astaksantynę [40, 41]. Ponadto fotosyntetyzujące bakterie *Bradyrhizobium* sp. [21] i halofilne

Halobacterium sp. [3] są producentami ciemnoczerwonej kantaksantyny.

Drożdże produkują przede wszystkim astaksantynę i karotenoidy. Za najlepszego kandydata na komercyjnego producenta astaksantyny uważane są drożdże z gatunku *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma)*, zaś karotenoidy są produkowane przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* [35]. Wydajność takiej syntezy w przypadku dzikich szczepów jest bardzo mała, dlatego w celu jej podniesienia stosuje się modyfikacje warunków hodowli i składu podłoża [31] oraz wykorzystuje techniki inżynierii genetycznej [37].

Bakterie i drożdże, których metabolity nie zawierają substancji barwnych mogą stać się ich producentami w wyniku modyfikacji genetycznych. W ciągu ostatnich kilku lat sklonowano znaczącą liczbę genów kodujących szlaki syntezy karotenoidów *crt* (dotychczas ponad 150 genów kodujących 24 enzymy). Heterologiczna ekspresja większości tych genów sprawiła, że stało się możliwe zaprojektowanie ścieżek biosyntezy karotenoidów w komórkach drożdży i bakterii m.in. *E. coli*, które nie produkują tej grupy związków. Ekspresja określonych kombinacji genów i łączenie ścieżek biosyntezy na poziomie molekularnym zaowocowały syntezą nowych, rzadkich i cennych karotenoidów, które mogą odznaczać się różnorodnością barw [33].

Geny kodujące wczesne enzymy szlaku biosyntezy karotenoidów: syntazę GGDP, syntazę fitoenu i desaturazę fitoenu stanowią ponad połowę wszystkich klonowanych genów *crt*. Przykładem enzymu o dużym znaczeniu w syntezie różnorodnych karotenoidów jest desaturaza fitoenu, która może tworzyć różne ilości podwójnych wiązań w fitoenie. U roślin, cyjanobkterii oraz alg powstają dwa wiązania i syntezowany jest ζ-karoten, z kolei u bakterii z rodzaju *Rhodobacter* powstają trzy wiązania tworząc neurosporen. Powstawanie czterech wiązań skutkuje syntezą likopenu (głównie u eubakterii i grzybów), a pięciu wiązań 3,4-hydrolikopenu w komórkach *Neurospora crassa* [12].

Pierwsze eksperymenty mające na celu projektowanie syntezy karotenoidów były prowadzone poprzez usuwanie niektórych genów *crt* z kasety ekspresyjnej na drodze delecji. Takie podejście skutkowało ekspresją całkiem nowych enzymów i syntezą nieoczekiwanych karotenoidów u *Erwinia herbicola* i *Rhodobacter sphaeroides* [15].

Proces modyfikacji genów *crt* bazuje na losowej mutagenezie, rekombinacji i selekcji genów kodujących dane białka. Przykładem tego typu działania mogą być modyfikacje desaturazy fitoenu (*crtI*) i cyklazy likopenu (*crtY*) w kierunku syntezy nowych karotenoidów w komórkach *E. coli*. Oba enzymy odgrywają kluczową rolę na etapie rozgałęzienia ścieżki biosyntezy acyklicznych i cyklicznych karotenoidów. Zmiana specyficzności substratowej produktów genów *crtI* i *crtY*, modyfikacja właściwości katalitycznych lub tasowanie genów *crtI* i *crtY,* umożliwia syntezę różnorodnych karotenoidów [2]. Pomimo obiecujących wyników badań związanych z projektowaniem szlaków biosyntezy karotenoidów w *E. coli*, przeszkodą w komercyjnym wykorzystaniu tego gatunku bakterii do produkcji barwników jest fakt posiadania przez nią ograniczonego zasobu podstawowych prekursorów izoprenoidowych potrzebnych do biosyntezy karotenoidów. Poziom produkcji karotenoidów w rekombinowanych komórkach *E. coli* jest niski (10–500 μg/g suchej masy) w porównaniu do komercyjnie wykorzystywanych drobnoustrojów takich jakich *Dunalliella* sp., *Haematococcus* sp. i *X. dendrorhous*, dla których poziom produkcji osiąga nawet 50 mg na gram suchej masy [16].

Ze względu na toksyczne działanie zbyt wysokiego stężenia prekursorów izoprenoidowych na komórki *E. coli* można stwierdzić, że prawdopodobnie maksymalny możliwy poziom produkcji karotenoidów w tej bakterii został już osiągnięty [32]. W przeciwieństwie do bakterii drożdże są zdolne do akumulowania dużych ilości izoprenoidowych pochodnych ergosterolu. Biosynteza ergosteroli w niekarotenoidowych drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* z sukcesem została skierowana w stronę produkcji karotenoidów [25]. Nadekspresja reduktazy 3-hydroksymetyloglutarylo koenzymu A i blokada syntezy ergosteroli spowodowała nadprodukcję likopenu w komórkach *C. utilis* (7,8 mg/g suchej masy) [34].

Pomyślne rezultaty składania genów *crt* i projektowania nowych ścieżek syntezy na poziomie molekularnym poszerzyło możliwości produkcji strukturalnie odmiennych karotenoidów. Ostatnie dokonania inżynierii genetycznej powinny pozwolić na produkcję nowych karotenoidów, znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym oraz medycynie.

5. Podsumowanie

Procesy pozyskiwania pigmentów pochodzenia naturalnego oparte na ekstrakcji są mało wydajne i wymagają dużego nakładu surowca, a co za tym idzie są kosztowne i nieopłacalne. Otrzymane w ten sposób barwniki wykazują małą odporność na działanie takich czynników środowiska jak i zmienne pH, temperatura, natlenienie czy działanie światła słonecznego. Aspekty te w znaczący sposób obniżają możliwości stosowania barwników naturalnych w przemyśle spożywczym. Alternatywę dla tych związków stanowią barwniki sztuczne czyli związki azowe, charakteryzujące się znacznie większą intensywnością kolorów i trwałością, a ich synteza jest prosta i tania. Okazuje się jednak, że substancje te w procesach *in vitro* ulegają redukcji do amin aromatycznych, co jest

zjawiskiem niekorzystnym z powodu wzrostu toksyczności powstających związków. Pomimo, że wszystkie związki azowe stosowane w przemyśle spożywczym zawierają grupy sulfonowe, zwiększające ich rozpuszczalność w wodzie i tym samym ułatwiające usunięcie ich samych lub ich metabolitów z organizmu, to niektóre z nich (np. tartrazyna) mogą powodować alergie lub wykazywać działanie kancerogenne. Dlatego zasadnym wydają się dalsze badania nad mikrobiologicznymi producentami barwników, cechujących się wysoką wydajnością syntezy związków o porównywalnej do pigmentów syntetycznych stabilnością. Ponadto duże możliwości niosą ze sobą modyfikacje genetyczne takie jak np. tasowanie genów *crt* i projektowanie nowych ścieżek syntezy na poziomie molekularnym, stwarzające nowe możliwości produkcji strukturalnie odmiennych karotenoidów. Być może rozwój metod mikrobiologicznych opartych na inżynierii genetycznej lub badania dotychczas niepoznanych, potencjalnych źródeł substancji barwiących przyniosą w przyszłości rozwiązanie problemów, z jakimi spotykają się technolodzy i spowoduje całkowite wyparcie z rynku barwników sztucznych na rzecz barwników pochodzenia mikrobiologicznego, których różnorodność jest wciąż godna zainteresowania mikrobiologów, biochemików oraz genetyków.

Piśmiennictwo

1. Adrio J.L., Demain A.L.: Fungal biotechnology. *Ind. Microbiol.* **6**, 191–199 (2003)
2. Arnold F.H., Volkov A.: Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 54–59 (1999)
3. Asker D., Ohta Y.: Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 617–621 (1999)
4. Baker R.A., Tatum J.H.: Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. *J. Ferment Bioeng.* **85**, 359–361 (1998)
5. Butler M.J., Day A.W.: Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol*. **44**, 1115–1136 (1998)
6. Cohen Z.: Products from microalgae. Handbook for Microalgal Mass Cultur. In: Richmond, A.(Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL., USA, 1986, s. 421–454
7. Delgado-Vargas F., Peredes-Lopez O.: Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRP Press LLC, 2003, s. 70–85, 149–151
8. Dufosse L., Galaup P., Yaron A., Arad M., Blanc P., Kotamballi N., Murthy C., Ravishankar G.A.: Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 389–406 (2005)
9. Dufossé L.: Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technol. Biotechnol.* **44 (3)**, 313–321 (2006)
10. Duran N., Tixeira M.F.S., de Conti R., Esposito E.: Ecological--friendly pigments from fungi. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, **42**, 53–66 (2002)
11. Firn R.D., Jones C.G.: Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep*. **20**, 382–391 (2003)
12. Garcia-Asua G., Lang H.P., Cogdell R.J., Hunter C.N.: Carotenoid diversity:a modualar role for the phytoene desaturase step. *Trends Plant Sci.* **3**, 445–449 (1998)
13. Glazer, A.N.: Phycobiliproteins. Chemicals from microalgae, Taylor and Francis, New York, 1999, s. 261–280
14. Hendry G.A.F., Houghton J.D.: Natural food colorants, Blackie Academic & Professional, II ed., 1996, s. 135–139, 146–154
15. Hunter C.N., Hundle B.S., Hearst J.E., Lang H.P, Gardiner A.T., Takaichi S., Cogdell R.J.: Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and Rhodobacter sphaeroides. *J. Bacteriol.* **176**, 3692–3697 (1994)
16. Johnson E.A., Schroeder W.A.: Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**, 119–178 (1995)
17. Jongrungruangchok S., Kittakoop P., Yongsmith B., Bavovada R., Tanasupawat S., Lartpornmatulee N., Thebtaranonth Y.: Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus Monascus kaoliang. *Phytochemistry*, **65**, 2569–2575 (2004)
18. Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A.: Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* **38**,143–158 (2003)
19. Liu B.H., Wu T.S., Su M.C., Chung C.P., Yu F.Y.: Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in monascus fermentation products. *J. Agricult. Food Chem.* **53**, 170–175 (2005)
20. López-Nieto M.J., Costa J., Peiro E., Méndez E., Rodríguez--Sáiz M., de la Fuente J.L., Cabri W., Barredo J.L.: Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **66**, 153–159 (2004)
21. Lorquin J., Molouba F., Dreyfus B.L.: Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium strains*. *Appl. Environ. Microbial.* **63**, 1151–1154 (1997)
22. Mapari S., Nielsen K., Larsen T., Frisvad J., Meyer A., Thrane U.: Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotech.* **16**, 231–238 (2005)
23. Mapari S.A.S., Thrane U., Meyer A.S.: Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotech.* **28**, 300–307 (2010)
24. Medenstev A.G., Akimenko V.K.: Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*, **47**, 935–959 (1998)
25. Misawa N., Shimada H.: Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J. Biotechnol.* **59**, 169–181 (1998)
26. Mukherjee G., Singh S.K.: Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochem.* **46**, 188–192 (2011)
27. Perez-Garcia O., Escalante F.M.A., de-Bashan L.E., Bashan Y.: Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* **45**, 11–36 (2011)
28. Pitt J.I.: The Genus Penicillium and its Teleomorphic States, Eupenicillium and Talaromyces. Academic Press, London, UK, 1979
29. Raja R., Hemaiswarya S., Rengasamy R.: Explotation of *Dunaliella* for β-karoten production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **74**, 517–523 (2007)
30. Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K.: Dodatki funkcjonalne do żywności, Agro & Ford Technology, Katowice, 1993, s. 205–215
31. Sakaki H., Nakanishi T., Satonaka K.Y., Miki W., Fujita T., Komemushi S., Properties of a high-torularhodin mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *J. Biosci. Bioeng*. **89**, 203–205 (2000)
32. Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G., Knörzer O.: The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli. Tibtech*. **17**, 233–137 (1999)
33. Sandmann G.: Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci.* **6**, 14–17 (2001)

34. Shimada H., Kondo K., Fraser P., Miura Y., Saito T., Misawa N.: Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl. Environment. Microbiol.* **64**, 2676–2680 (1998)
35. Simova E.D., Frengova G.I., Beshkova D.M.: Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **31**, 115–121 (2004)
36. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran D., Isambert A.: Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 87–96 (2006)
37. Tinoi J., Rakariyatham N., Deming R.L.: Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochem*. **40**, 2551–2557 (2005)
38. Unagul P., Wongsa P., Kittakoop P., Intamas S., Srikitikulchai P., Tanticharoen M.: Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Soc. Ind. Microbiol.* **32**, 135–140 (2005)
39. Vidyalakshim R., Paranthaman R., Murugesh S., Singaravadive K.: Microbial Bioconversion of Rice Broken to Food Grade Pigments. *Global J. Biotech. Biochem.* **2**, 84–87 (2009)
40. Yokoyama A., Adachi K., Shizuri Y.: New carotenoid glucosides, astaxanthin glucoside and adonixanthin-producing glucoside, isolated from the astaxanthin – producing marine bacterium *Agrobacterium aurantiacum. J. Nat. Prod*. **58**, 1929–1933 (1995)
41. Yokoyama A., Miki W.: Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin – producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum. FEMS Microbiol. Lett.***128**, 136–144 (1995)
42. Zhi-Wei Y., Jian-Guo J., Guang-Hong W.Ł Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotech. Adv.* **26**, 352–360 (2008)
43. www. Foodnavigator-usa.com
44. www. Leatherheadfood.com
45. www.Organic-chemistry.org
46. www.Patentstorm.us/patents/6340586

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 177–184
http://www.pm.microbiology.pl

OZONOTERAPIA ORAZ ZASTOSOWANIE OZONU W DEZYNFEKCJI

Dariusz Białoszewski[1]*, Ewa Bocian[2], Stefan Tyski[2, 3]

[1]Zakład Rehabilitacji Oddziału Fizjoterapii II Wydziału Lekarskiego, Warszawski Uniwersytet Medyczny
[2]Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, Warszawa
[3]Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizm działania ozonu. 3. Rozwój ozonoterapii. 4. Ozon w dezynfekcji wody i powietrza. 5. Zastosowanie ozonu w przemyśle spożywczym. 6. Zastosowanie ozonu w terapii. 7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ozonu oceniana *in vitro*. 8. Podsumowanie

Ozonotherapy and application of ozone as disinfectant

Abstract: Unquestionable bactericidal activity of ozone has been known for over 100 years. The possibility of artificial production of ozone in the specially constructed generators allows for studying the activity of ozone against microorganisms. Medical application (ozonotherapy) of ozone (gas naturally occurring in nature) is nothing more than one more method of physical therapy. In Poland, ozonotherapy was applied for the first time by professor Hubert Antoszewski, who working in Silesia and being a strong follower of this method, set up the Polish Society of Ozonotherapy (PTOT) located in Katowice. Ozonotherapy is still, despite the appearing increase in the number of major scientific reports about its efficacy, treated as a method of alternative medicine and for this reason it is not refunded by the health systems of many countries. Ozone is toxic to humans and when inhaled, it can cause serious health problems – if its concentration in air exceeds a safe value. Toxicity of ozone depends on its concentration, time of exposure and route of administration. Despite its toxicity, bactericidal, fungicidal and virucidal activity, ozone is used in ozonotherapy in many medical fields, e.g. surgery, dermatology, laryngology, ophthalmology, gynecology and dentistry. Additionally, ozone is also applied for disinfection of water and air, and in food industry. The Department of Antibiotics and Microbiology at the National Medicines Institute in Warsaw, has performed studies concerning antimicrobial activity of ozonized water and oxygen-ozone gas mixture, according to the methodology developed in the relevant European Standards (EN). These studies were intended for evaluation of bactericidal and fungicidal activity of disinfectants and antiseptics. The present state of knowledge, taking into consideration the research related to ozone antimicrobial activity, allows us to treat ozonotherapy as an evidence-based method (EBM). Other applications of this physical method are still disputable despite many studies.

1. Introduction. 2. Mechanism of action of ozone. 3. Developement of ozonotherapy. 4. Ozone in water and air disinfection. 5. Use of ozone in the food industry. 6. Use of ozone in therapy. 7. Antimicrobial activity of ozone evaluated *in vitro*. 8. Summary

Słowa kluczowe: mieszanina tlenowo-ozonowa, ozon, ozonoterapia, ozonowana woda, dezynfekcja
Key words: oxygen-ozone gas mixture, ozone, ozonotherapy, ozonized water, disinfection

1. Wprowadzenie

Ozon, jako naturalny składnik atmosfery powstaje w stratosferze na wysokości około 30 km, jako wynik działania promieni ultrafioletowych na tlen. Możliwość sztucznego wytwarzania ozonu w specjalnie skonstruowanych generatorach pozwala na prowadzenie badań nad wpływem ozonu na żywe organizmy. Pierwsze, udokumentowane wyniki zwalczania zakażeń przyrannych za pomocą ozonu odnotowano już prawie 100 lat temu [52]. Zastosowanie medyczne ozonu (ozonoterapia) – naturalnie występującego w przyrodzie gazu jest w swej istocie niczym innym jak jeszcze jedną metodą fizykoterapii. Spełnia bowiem kryteria dla takiej metody podane przez P o n i k o w s k ą i F e r s o n a, którzy uznali ozon za gaz leczniczy mający zastosowanie w balneologii [42].

Pomimo toksycznych właściwości ozonu, jego aktywność bakterio-, grzybo- i wirusobójcza jest wykorzystywana w ozonoterapii prowadzonej m.in. w obszarze chirurgii, dermatologii, laryngologii, okulistyce, ginekologii czy stomatologii. Ponadto, do sterylizacji wrażliwych na wysoką temperaturę oraz wilgoć narzędzi i materiałów stosowanych w opiece medycznej, wykorzystuje się synergistyczne działanie par nadtlenku wodoru i ozonu (zwane w literaturze jako peroxone lub perozone), jako nową technologię szybkiej sterylizacji niskotemperaturowej o nazwie systemu „3M™ Optreoz™ 125-Z" [36]. System ten zapewnia dobrą penetrację długich i wąskich kanałów wewnętrznych, bez ryzyka uszkodzenia materiału, pozwalając na sterylizację np. długich wielokanałowych endoskopów giętkich. Ozon znalazł zastosowanie również jako środek do dezynfekcji

* Autor korespondencyjny: Zakład Rehabilitacji Oddziału Fizjoterapii II Wydziału Lekarskiego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Solec 57, 00-424 Warszawa; tel. (022) 629 46 65; e-mail: dariusz.bialoszewski@wum.edu.pl

wody, powietrza oraz jako środek dezynfekcyjny i konserwujący w przemyśle spożywczym.

2. Mechanizm działania ozonu

Ozon jest jednym z najsilniejszych utleniaczy. Reagując ze związkami organicznymi powoduje ich utlenianie. W pierwszym etapie działania ozonu dochodzi do szybkiego przerwania ściany komórkowej bakterii. Następnie, reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów wchodzących w skład błony cytoplazmatycznej ulegają peroksydacji, co prowadzi do powstania nadtlenków tych związków. Produkty peroksydacji zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych. Powodują ich depolaryzację, hamują aktywność enzymów błonowych i białek transportowych. Ponadto, w reakcjach z silnymi utleniaczami może również dojść do utlenienia aminokwasów, białek i kwasów nukleinowych [28].

Ozon jest gazem toksycznym dla człowieka, wdychany może powodować poważne problemy zdrowotne, jeśli jego stężenie w powietrzu przekroczy bezpieczną wartość. Symptomy takie jak: uczucie suchości w gardle i w ustach, kaszel, bóle głowy i klatki piersiowej mogą pojawić się przy dłuższym czasie ekspozycji na ozon i ulegają nasileniu również przy wyższych jego stężeniach. W szeregu badaniach na zwierzętach dowiedziono szkodliwego działania ozonu na układ oddechowy, procesy odpornościowe i wykazano jego genotoksyczność [53]. Ozon należy do grupy egzogennych czynników wyzwalających aktywne formy tlenu, odpowiedzialne za szereg efektów biologicznych. Organizmy tlenowe posiadają systemy obronne unieczynniające aktywne formy tlenu, jednakże układ obronny komórki posiada określone możliwości tego unieczynniania, których wyczerpanie może powodować lawinowy wzrost stężenia rodników tlenowych w komórce. W wyniku działania ozonu na podwójną nić DNA, w układach *in vitro*, może dochodzić do pęknięć połączeń pomiędzy pętlami tego kwasu, a także pomiędzy DNA a białkami. W warunkach *in vivo*, skutki działania ozonu nie muszą być równie niebezpieczne, ponieważ uszkodzenia DNA mogą być sprawnie usuwane przez komórkowe systemy naprawcze, a i stężenie ozonu może być dużo mniejsze, niż w warunkach doświadczalnych [53].

Toksyczność ozonu zależy od jego stężenia, czasu ekspozycji i drogi podania. Ozon podawany drogą wziewną może powodować nieodwracalne zmiany w komórkach rzęskowych płuc, zmieniając strukturę ich błon komórkowych, czego konsekwencją jest zwłóknienie płuc. Według rozporządzenia Ministra Środowiska „w sprawie dokonywania oceny poziomów substancji w powietrzu", dopuszczalny poziom ozonu w powietrzu wynosi 120 $\mu g/m^3$ – uśredniony wynik pomiarów w ciągu 8 godzin [44].

3. Rozwój ozonoterapii

Ozon odkryto ponad 170 lat temu. W Tabeli I zestawiono istotne daty i wydarzenia związane z zastosowaniem ozonu w terapii.

Ważnym wydarzeniem w rozwoju badań ozonu było utworzenie w 1971 r. International Ozone Institute (IOI), przemianowanego w 1973 r. na towarzystwo naukowe o nazwie: International Ozone Associations (IOA), które miało służyć za centrum myśli i technologii związanych z wieloaspektowymi zastosowaniami ozonu w przemyśle i medycynie. Organizacja IOA to ogólnoświatowe forum badań i wymiany doświadczeń łączące naukowców, inżynierów, projektantów systemów, technologów, producentów wyposażenia i użytkowników technologii ozonowych. IOA wprowadziła szereg ogólnoświatowych programów obejmujących m.in. takie obszary jak: zastosowanie ozonu w dezynfekcji wody i ścieków, w produkcji i przetwórstwie żywności, a także badanie medycznych zastosowań ozonu.

Obecnie IOA zrzesza ponad 1300 członków, którzy prowadzą programy IOA w trzech regionalnych grupach światowych: panamerykańskiej (PAG: Ameryka Północna, Centralna i Południowa), japońskiej (NIG) i grupie EA3 (EA3G: Europa, Afryka, Azja, Australia) zrzeszającej ponad 40 krajów, prowadzących badania nad ozonem i stosujących go ze wskazań medycznych.

IOA wydaje regularnie czasopisma: *IOA Newsletter – Ozone News* i dwumiesięcznik *Ozone: Science & Engineering* (OS&E). Odbyło się już 20 światowych kongresów IOA, ostatni miał miejsce w Paryżu, w maju 2011 r.

W Europie od 1971 r. działa European Cooperation of Medical Ozone Societies z siedzibą w Paryżu zrzeszające obecnie 4 regionalne towarzystwa działające też w ramach EA3G: niemieckie: Ärztliche Gesellschaft für Ozon-Anwendung in Prävention und Terapie; szwajcarskie: Swiss Medical Society for Ozone and Oxygen Therapies – SAGOS; austriackie: Ozone Therapists' Interest Group – OTIG i włoskie: International Medical Ozone Society Italy – IMOS. Grupa ta w 2012 r., w dniach 4–6 lipca, zorganizowała we Francji, w Ecole d'ingenieurs de Purpon w Tuluzie kolejne spotkanie pod hasłem „Ozone & Related Oxidants to Meet Essential Human Needs Uses for Agri-Food, Industry, Water and Health". Z kolei Grupa PAG organizuje swoje sympozjum we wrześniu 2012 r., w Milwaukee.

Ogromne zasługi dla nowoczesnej ozonoterapii oddali dr Renate V i e b a h n autorka uznanych podręczników tej metody i, obecnie emerytowany, profesor fizjologii Velio B o c c i, który od 40 lat propaguje i bada tę metodę organizując wiele kursów i szkoleń jako wieloletni Prezydent IMOS i Dyrektor Instytutu Wydziału Farmacji Uniwersytetu w Sienie.

W Polsce po raz pierwszy zastosował klinicznie ozonoterapię, pracujący w Katowicach, prof. Hubert

Tabela I

Wybrane istotne daty w rozwoju ozonoterapii – zestawienie własne

Rok	Wydarzenie	Pismiennictwo
1840	Niemiecki chemik Friedrich Schönbein (1799–1868) odkrywa ozon i nazywa go dla szczególnego zapachu – ozonem, od greckiego słowa oznaczającego zapach – *ozein*	[43]
1856	Pierwsze medyczne użycie ozonu w Stanach Zjednoczonych przez homeopatę J. L. Martina	[19]
1857	Wynalezienie pierwszego, laboratoryjnego generatora ozonu tzw.: lampy ozonowej (Werner von Siemens)	[43]
1896	Stany Zjednoczone – Nikola Tesla opatentowuje pierwszy generator do przemysłowej produkcji ozonu	[53]
1900	Stany Zjednoczone – Nikola Tesla założył „Tesla Ozon Co", który sprzedaje wynalezione generatory ozonu i ozonowaną oliwę dla lekarzy do użytku medycznego	[53]
1873	Odkrycie zdolności zabijania drobnoustrojów przez ozon (Fox)	[16]
1885	Pierwsza anglojęzyczna publikacja dotycząca leczenia za pomocą ozonu – zatytułowana „Ozone" autorstwa Ch. J. Kenwortha z Jacksonville	[30]
1915	Pierwsze zastosowanie ozonu do leczenia ran	[56]
1916	Pierwsze doniesienie o przydatności leczenia ozonem w przypadkach zakażeń kości	[50]
1935	Pierwsze stosowanie insuflacji ropnych przetok ozonem (Payer i Auborg)	[7]
1971	Powstaje niemieckie „Medyczne Stowarzyszenie Terapii Ozonem"	–
1972	Powstaje Międzynarodowe Stowarzyszenie Terapii Tlenowej założone przez George Freibotta, które stało się następcą założonego w 1913 r. „Związku Terapii Tlenowej"	–
1971	Powstaje międzynarodowe towarzystwo naukowe: International Ozone Associations – IOA	–
1979	Wydanie przez E. Fischera w Verlag für Medizin w Heidelbergu pierwszego nowoczesnego, profesjonalnego podręcznika ozonoterapii klinicznej – „Das Medizinische Ozon" autorstwa H. H. Wolffa	[57]
1979	Pierwsze doniesienie o zastosowaniu ozonu w leczeniu miażdżycy zarostowej tętnic; mikroangiopatii i polineuropatii cukrzycowej oraz skutków niewydolności krążenia żylnego	[41]
1983	Pierwszy Międzynarodowy Kongres dotyczący medycznych zastosowań ozonu, Waszyngton, Stany Zjednoczone	–
1986	Pierwsze w Polsce zastosowanie kliniczne ozonoterapii	[4]
1995	Pierwsze na świecie podanie mieszaniny tlenowo-ozonowej do komór bocznych mózgu	[5]
2000	Pierwsze podane w piśmiennictwie zastosowanie głębokich pooperacyjnych insuflacji mieszaniną ozonowo-tlenową	[12]
2003	Pierwsze podane w piśmiennictwie śródoperacyjne zastosowanie ozonoterapii powierzchniowej w profilaktyce zakażeń miejsca operowanego w ortopedii	[9]

A n t o s z e w s k i, który będąc gorącym zwolennikiem tej metody powołał do życia Polskie Towarzystwo Ozonoterapii (PTOT) z siedzibą w Katowicach. Jako Prezes PTOT zorganizował pierwsze w Polsce Sympozjum Ozonoterapii oraz trzy Ogólnopolskie Kongresy Polskiego Towarzystwa Ozonoterapii – pierwszy w 1993 r. w Katowicach, a ostatni w Szczyrku w 1996 r. W 1997 r. pojawiła się pod jego redakcją pierwsza w Polsce publikacja opisująca terapeutyczne zastosowanie ozonu w medycynie [3].

Po odejściu prof. H. A n t o s z e w s k i e g o na emeryturę działalność PTOT zaczęła zamierać, a po Jego śmierci, we wrześniu 2007 r. w zasadzie zupełnie ustała i wymaga reaktywacji, chociaż być może w nieco innej formule.

Znaczne zasługi dla rozwoju ozonoterapii w Polsce położył dr Piotr S z m u r ł o prowadzący badania wraz z prof. Ireną P o n i k o w s k ą w kierowanej przez nią Klinice Balneologii i Medycyny Fizykalnej UMCS z siedzibą w Ciechocinku. Powstało tam wiele pomysłów dotyczących zastosowań ozonu w balneologii i prace nad zastosowaniami tej metody w balneologii i fizykoterapii są tam nadal prowadzone [55].

Zasłużony dla polskiej ozonoterapii jest również mgr inż. Wiesław B r o j e k, entuzjasta tej metody, współtwórca oraz producent jedynego do tej pory rdzennie polskiego, stale unowocześnianych aparatów do ozonoterapii (seria ATO_3)

Obecnie terapia ozonem jest dopuszczona prawnie i stosowana z powodzeniem w: Niemczech, Włoszech, Francji, Rosji, Rumunii, Polsce i Ukrainie, w Czechach, na Węgrzech, w Jugosławii, Bułgarii, Izraelu, Japonii, Malezji, Singapurze, Brazylii, na Kubie, w Meksyku, Zjednoczonych Emiratach Arabskich oraz w Kanadzie i w większości stanów Stanów Zjednoczonych (Alaska, Waszyngton, Arizona, Kalifornia, Kolorado, Oregon, Newada, Nowy Meksyk, Teksas, Oklahoma, Georgia, Nowy Jork, Północna i Południowa Karolina, Ohio, Minnesota). W innych krajach lub stanach, jest z niejasnych powodów, uznawana w całości za medyczne postępowanie niekonwencjonalne. Należy zaznaczyć, że ozonoterapia, zwłaszcza w swym aspekcie bakteriobójczym, stosowana zgodnie z zaleceniami medycznymi i w sposób prawidłowy jest metodą bezpieczną i nietoksyczną [17, 27].

Ozonoterapia jest, jak już wspomniano nadal, pomimo ciągłego ukazywania się wielu poważnych doniesień naukowych o jej skuteczności, traktowana jako metoda medycyny alternatywnej. Z tego powodu

leczenie za jej pomocą nie jest refundowane przez systemy opieki zdrowotnej wielu z ww. krajów. Jest to szczególnie zdumiewające, jeśli wziąć pod uwagę chociażby znane od ponad 100 lat, niepodważalne działanie bakteriobójcze ozonu [15, 17, 29, 52].

4. Ozon w dezynfekcji wody i powietrza

Ozon, ze względu na silne działanie przeciwdrobnoustrojowe znalazł zastosowanie jako skuteczny środek do dezynfekcji wody do picia, wody w basenach, wody przemysłowej, wody do celów chłodniczych oraz ścieków. Jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa przewyższa aktywność chloru około 50-krotnie [49]. W badaniach porównawczych aktywności ozonu i podchlorynu sodu wobec bakterii występujących w ściekach szpitalnych – głównie z rodzaju *Enterococcus***,** wykazano znacznie wyższą skuteczność bakteriobójczą ozonu, nawet wobec enterokoków opornych na wankomycynę [49]. Dodatkową zaletą ozonu jest znacznie krótszy czas działania w porównaniu z czasem biobójczego działania podchlorynu sodu. Obok działania bakteriobójczego, ozon wykazuje również ważną cechę w przypadku zapewnienia czystości wody – zdolność ograniczania liczebności glonów i pierwotniaków oraz pleśni i innych grzybów. Systemy ozonowania instalowane w celu dezynfekcji wody zdatnej do konsumpcji zapewniają ochronę przed skażeniem *Cryptosporidium* sp. [49]. Ozon stosowany jest również do ciągłego uzdatniania i napowietrzania wody w zbiornikach hodowlanych ryb. W obszarze weterynaryjnym, ozon może być również wykorzystywany do dezynfekcji ścieków, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się drobnoustrojów do środowiska. Bakterie pochodzące ze ścieków odzwierzęcych, w wyniku częstego, prewencyjnego stosowania antybiotyków takich jak: chlorotetracyklina, linkomycyna, sulfametazyna, czy tetracyklina, są często na nie oporne [37]. M a c a u l e y i wsp. [37] przeprowadzili eksperyment, w którym porównano aktywność chloru, ultrafioletu i ozonu wobec bakterii obecnych w ściekach pochodzących z hodowli świń. Zastosowanie chloru o stężeniu 30 mg/L powodowało stopień redukcji liczby bakterii wynoszący 2,2–3,4 log, jednocześnie zidentyfikowano szczepy dwóch opornych na chlor gatunków *Bacillus subtilis* i *B. licheniformis*. Zastosowanie promieni UV prowadziło do inaktywacji prawie wszystkich bakterii, jednakże było energochłonne, natomiast ozon w stężeniu 100 mg/L powodował stopień redukcji liczby bakterii ściekowych na poziomie 3,3–3,9 log (gęstość bakteryjnej zawiesiny wyjściowej wynosiła ok. 7 log cfu/mL).

Ozon w formie gazowej wykorzystywany jest do dezynfekcji pomieszczeń mieszkalnych, w budynkach użyteczności publicznej takich jak: teatry, kasyna czy szpitale [49]. Jest skuteczny przy odgrzybianiu starych, zaniedbanych mieszkań czy domów, w których z powodu np. złej wentylacji i dużej wilgotności rozwinęły się grzyby pleśniowe, najczęściej z gatunków *Stachybotrys chartarum* czy *Aspergillus versicolor* [49]. Należy jednak pamiętać, aby unikać bezpośredniego kontaktu ludzi z mieszaniną ozonowo-powietrzną i użytkować oczyszczone ozonem pomieszczenia po odpowiedniej wentylacji, gdy resztki ozonu ulegną usunięciu lub rozkładowi.

Jedne z ostatnich badań H u t t u n e n i wsp. [26] dotyczą możliwości wykorzystania ozonowania do dezynfekcji zakurzonych mebli pochodzących z wilgotnych i zaniedbanych budynków. Zastosowanie urządzenia myjącego przy użyciu pary i jednocześnie dezynfekującego za pomocą ozonu o stężeniu ponad 30 ppm, najczęściej prowadziło do redukcji drobnoustrojów w kurzu. Liczba większości gatunków grzybów ulegała obniżeniu, zwłaszcza dotyczyło to grzybów z rodzajów: *Penicillium, Cladosporium*, *Candida*, *Aureobasidium, Rhizopus*, *Trichoderma* i *Actinomycetes*. Jednakże zaobserwowano, że metoda ta nie usuwa czy też nie niszczy wszystkich gatunków grzybów. Zidentyfikowano cztery gatunki, które były obecne w kurzu po procesie mycia i dezynfekcji: *Cladosporium pullulans, C. cladosporides*, *C. herbarum* i *Epicoccum nigrum*.

5. Zastosowanie ozonu w przemyśle spożywczym

Ozon może być dodawany do płynów stosowanych do mycia warzyw, owoców, ryb i mięsa w celu dezynfekcji i przedłużenia trwałości tych produktów [38, 40]. Przeprowadzono badania efektywności działania ozonowanej wody o zawartości ozonu 3 ppm, 5 ppm i 10 ppm, użytej do płukania sałaty lodowej przez 5 min. w temperaturze pokojowej [33]. Zaobserwowano znaczny spadek liczby naturalnie bytujących bakterii na świeżo ściętej sałacie, gdy stosowano wodę ozonowaną, ale tylko do stężenia 5 ppm ozonu. Świeże warzywa zanieczyszczone *Yersinia enterocolitica* były przyczyną epidemii, którą opanowano dzięki zastosowaniu wody ozonowanej o stężeniu ozonu 1,4 i 1,9 ppm. Już po 1 minucie zaobserwowano redukcję populacji drobnoustrojów w wodzie, wynoszącą odpowiednio: 4,6 i 6,2 log cfu/mL [48]. W innych badaniach wykazano, że ozonowana woda (5 ppm ozonu) stosowana do płukania przez 1 min powoduje redukcję liczby bakterii *Y. enterocolitica* i *Listeria monocytogenes* na powierzchni ziemniaków, odpowiednio o 1,6 i 0,8 log cfu/g) [48]. Zastosowanie ozonowanej wody o stężeniu ozonu 1,6 i 2,2 ppm przez 1 min, dało również dobre rezultaty w ograniczaniu kilku epidemii shigellozy, związanych ze świeżymi warzywami. Odnotowano redukcję liczebności populacji *Shigella sonnei* w wodzie, odpowiednio o 3,7 i 5,6 log cfu/mL (gęstość zawiesiny wyjściowej wynosiła 9 log cfu/mL)

[48]. Redukcję liczby bakterii, takich jak *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* uzyskiwano również w przypadku mycia ozonowaną wodą małych owoców takich jak maliny czy truskawki (o 5,6 log i 4,5 log – odpowiednio, w przypadku dezynfekcji malin oraz o 2,9 log i 3,3 log – odpowiednio, w przypadku dezynfekcji truskawek) [8]. K i m i H u n g [31] przeprowadzili badania dotyczące procesów dezynfekcji świeżych owoców (jagód). Do badań użyto szczep *E. coli* O157:H7, naniesiony na kwiaty i owoce jagód. Wykazano, że zastosowany do dezynfekcji ozon o stężeniu 4000 mg/L redukował liczbę komórek szczepu tylko o 0,66 log – w przypadku kwiatów i o 0,72 log w przypadku owoców jagód.

V u r m a i wsp. [59], w badaniach bakteriobójczej aktywności gazowego ozonu wobec szczepu *E. coli* O157:H7, wykazali redukcję liczby komórek do 2,4 log, 1,8 log i 1,4 log, w zależności od warunków badania. Gęstość zawiesiny wyjściowej wynosiła ok. 7 log cfu/mL, a zatem należy zwrócić uwagę na fakt, że mimo wykazanej bakteriobójczej aktywności ozonu, poziom redukcji może być niewystarczający do zapewnienia bezpieczeństwa konsumenta.

W innych badaniach wykazano skuteczność ozonu o stężeniu 0,1 ppm stosowanego przez 6 h w inaktywacji *E. coli* skażającej czarny pieprz w postaci ziarnistej i mielonej, co nie miało wpływu na cechy organoleptyczne [23].

Ozon stosowany przy produkcji napojów, do płukania butelek przed napełnieniem, czy dezynfekcji beczek dębowych w winiarniach, wykorzystywany jest nie tylko jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy, lecz także jako związek wiążący i usuwający żelazo, mangan, amoniak i siarkowodór z wody [40].

6. Zastosowanie ozonu w terapii

Zastosowanie ozonoterapii w stomatologii rozpoczęło się wkrótce po II wojnie światowej, pomimo braku nowoczesnych urządzeń do wytwarzania ozonu. Obecnie, dostępne są na rynku nowoczesne zestawy stomatologicznych generatorów ozonu pozwalające na precyzyjny i bezpieczny sposób aplikowania ozonu do konkretnego miejsca. W periodontologii leczone są zapalenia dziąseł i przyzębia, afty, opryszczki oraz kandydoza jamy ustnej. Właściwości bakteriobójcze ozonu wykorzystywane są zwłaszcza w stomatologii zachowawczej do leczenia próchnicy oraz zakażeń miazgi zęba. Zakażone i źle gojące się rany w obrębie jamy ustnej również z powodzeniem leczone są przy użyciu ozonu, co jest stosowane w implantologii i chirurgii stomatologicznej [28].

W badaniach *in vitro*, z użyciem drobnoustrojów chorobotwórczych takich jak: *Enterococcus faecalis*, *Peptostreptococcus micros*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*, przygotowanych zarówno w postaci zawiesiny jak i w postaci biofilmów, w modelu zakażenia korzenia zębowego, porównano skuteczność działania ozonu gazowego, wody ozonowanej, podchlorynu sodu (2,25% i 5,25%), diglukonianu chlorheksydyny (2%) i nadtlenku wodoru (3%), [25]. Znaczącą redukcję liczby patogennych drobnoustrojów w zawiesinach uzyskano po zastosowaniu ozonowanej wody o stężeniu ozonu do 5 μg/mL, jak również podchlorynu sodu i diglukonianu chlorheksydyny, natomiast gazowy ozon o stężeniu do 1 mg/mL i nadtlenek wodoru okazały się mniej skuteczne. W stosunku do drobnoustrojów w postaci biofilmów, aktywność ozonu gazowego i rozpuszczonego w wodzie była zależna od jego stężenia, gatunku badanego szczepu oraz czasu ekspozycji. Znamienną redukcję liczby drobnoustrojów uzyskano dla wysokiego stężenia gazowego ozonu i podchlorynu sodu, już po 1 minucie działania. Ozonowana woda o wysokim stężeniu ozonu (20 μg/mL) oraz diglukonian chlorheksydyny prawie całkowicie redukowały liczbę komórek bakterii w biofilmach, podczas gdy nadtlenek wodoru był mniej skuteczny [15, 29].

W innych badaniach z wykorzystaniem modelu zakażonego kanału zębowego, porównano aktywność przeciwbakteryjną laseru KTP (potassium-titanyl-phosphate), gazowego ozonu oraz roztworu podchlorynu sodu (2,5%) i roztworu chlorku sodu (0,85%) wobec szczepu *E. faecalis* [34]. Zarówno gazowy ozon, jak i laser KTP wykazywały redukcję liczby komórek bakterii wynoszącą 2,0 i 1,8 log – odpowiednio, w stosunku do wyjściowej zawiesiny szczepu *E. faecalis* o gęstości 5,5 log, jednakże nie tak wysoką, jak grupa kontrolna z podchlorynem sodu, dla której zaobserwowano całkowitą redukcję liczby komórek szczepu. Gazowy ozon okazał się bardziej skuteczny niż laser KTP. C a r d o s o i wsp. [21] przeprowadzili badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wody ozonowanej (24 mg/L ozonu) w modelu kanałów zębowych zakażonych szczepami *Candida albicans*, *E. faecalis* i zanieczyszczonych endotoksyną *Escherichia coli*. Zaobserwowano wysoki stopień redukcji liczby komórek *C. albicans* i *E. faecalis* w próbach pobranych bezpośrednio po irygacji ozonowaną wodą, natomiast w próbach pobranych po 7 dniach od ponownego wypełnienia kanałów zębowych ozonowaną wodą, zaobserwowano znaczny wzrost liczby komórek drobnoustrojów. Wobec endotoksyny *E. coli,* woda ozonowana nie wykazywała aktywności neutralizującej. Aktywność przeciwdrobnoustrojową ozonowanej wody (2 lub 4 mg/L ozonu) wobec szczepu *C. albicans* przedstawiono również w badaniach A r i t a i wsp. [6]. Wystarczył 1-minutowy czas kontaktu, aby w znacznym stopniu zredukować liczbę komórek drobnoustroju z powierzchni akrylowej protezy dentystycznej.

Przeciwbakteryjna aktywność gazowego ozonu określana była również wobec szczepu *Streptococcus mutans*, który może stanowić zagrożenie w jamie ustnej

w przypadku pozostałości pod elementami sztucznego uzębienia [41]. Zastosowanie ozonu dało wysoki poziom redukcji liczby komórek *S. mutans* po czasie kontaktu wynoszącym 80 sekund.

W wiarygodnych bazach piśmiennictwa jest zaskakująco mało prac, które w sposób zgodny z paradygmatem Evidence-Based Medicine (EBM) oceniają przydatność zastosowania ozonu w leczeniu zakażeń w chirurgii, zarówno pierwotnych jak i wtórnych, w tym jatrogennych. Jest to szczególnie zdumiewające, jeżeli wziąć pod uwagę znane od około 100 lat bakteriobójcze działanie ozonu oraz fakt, że pierwsze doniesienie pokazujące dobroczynne działanie ozonu w przypadkach powikłanych zakażeniem otwartych, wojennych złamań kości, zostało opublikowane przez majora S t o k e r a w czasopiśmie *Lancet* już we wrześniu 1916 r. [52].

W ostatnich latach pojawiły się jednak prace kliniczne, których wyniki potwierdzają skuteczność ozonoterapii w odniesieniu do leczenia i profilaktyki zakażeń w ortopedii i traumatologii narządu ruchu. Dotyczą one leczenia przewlekłych ran, owrzodzeń tkanek miękkich, zakażonych ran pourazowych oraz profilaktyki zakażeń szpitalnych po planowych, rekonstrukcyjnych zabiegach ortopedycznych [10, 12, 13, 32, 54, 60]. Pojawiły się również prace kliniczne, w których donosi się o skuteczności bakteriobóczej ozonu w leczeniu zapalenia otrzewnej i ropnych zapaleń w obrębie miednicy małej [35, 58].

Zaobserwowano również korzystne efekty stosowania płukania płynami ozonowanymi w profilaktyce zakażeń zarówno w ortopedii jak i chirurgii ogólnej [1, 9]. Brak natomiast przekonywujących, zgodnych z paradygmatem EBM, klinicznych dowodów na to, że jest to metoda przydatna w leczeniu różnych innych chorób – dotyczy to zwłaszcza podawania parenteralnego mieszaniny tlenowo-ozonowej w terapii takich chorób, jak: miażdżyca naczyń obwodowych, niektóre nowotwory, choroba zwyrodnieniowa stawów, dyskopatie lędźwiowe, dystrofie współczulne [2, 18, 20, 39, 51]. W powyższym zakresie ozonoterapia stosowana jest nadal w zasadzie empirycznie, wymaga dalszych badań i należy ją stosować z dużą ostrożnością.

Duże nadzieje rokują pojawiające się ostatnio prace eksperymentalne z wykorzystaniem modeli zwierzęcych (badania na szczurach), które prowadzone zgodnie z zasadami paradygmatu EBM udowadniają celowość stosowania parenteralnie ozonu celem leczenia wywołanych doświadczalnie zapaleń nerek lub otrzewnej [20, 22, 50].

Ozon może być stosowany zewnętrznie w postaci olejowych preparatów ozonowanych produkowanych na bazie oliwy z oliwek tzw. pierwszego tłoczenia. Są to preparaty o uznanej skuteczności w terapii zakażeń skórnych i terapii przewlekłych ran, np.: odleżyn i owrzodzeń podudzi w przebiegu zespołów pozakrzepowych [62]. Certyfikowany zgodnie z normami UE polski ozonowany preparat olejowy jest dostępny na rynku od 2001 r. Ozonowaniu można poddać również olej słonecznikowy. Sechi i wsp. [46] zastosowali taki właśnie preparat w celu wykazania jego bakteriobójczej aktywności wobec różnych szczepów bakterii, takich jak *Mycobacteria*, wielooporne Gram-dodatnie (gronkowce, paciorkowce, enterokoki) i Gram-ujemne bakterie (*P. aeruginosa* i *E. coli*), izolowane z różnych miejsc i materiałów (oczy, skóra, ropa, kał). Na podstawie określonych wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) stwierdzono bakteriobójczą aktywność ozonowanego oleju wobec wszystkich badanych szczepów. Wartości MIC (z wyłączeniem *Mycobacterium*) mieściły się w granicach: 1,18–9,5 mg/mL. Badania wykazały, że spośród badanych szczepów najbardziej wrażliwe były *Mycobacterium* spp. (MIC: 0,95–2,37 mg/mL).

Stosowanie ozonu metodami nieinwazyjnymi takimi, jak: kąpiele tlenowo-ozonowe, płukania płynami ozonowanymi i aplikowanie olejowych preparatów ozonowych spełnia w swej istocie założenia typowe dla fizykoterapii, w której wykorzystuje się przede wszystkim jego działanie antybakteryjne.

7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ozonu, oceniana *in vitro*

W Zakładzie Antybiotyków i Mikrobiologii Narodowego Instytutu Leków przeprowadzono we współpracy z Zakładem Rehabilitacji Oddziału Fizjoterapii II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego badania aktywności bakteriobójczej i grzybobójczej wody ozonowanej oraz mieszaniny tlenowo-ozonowej [11, 14]. Starano się przeprowadzić ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej zgodnie z metodyką opracowaną w odpowiednich normach europejskich (EN). Badania przeprowadzono zgodnie z normami: PN-EN 1040: Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawiesinowa metoda określania podstawowego działania bakteriobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych (Faza 1) i PN-EN 1275: Ilościowa zawiesinowa metoda określania podstawowego działania grzybobójczego lub podstawowego działania bójczego wobec grzybów drożdżopodobnych chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych (faza 1).

W badaniach zastosowano szczepy testowe bakterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* NCTC 10538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, a także izolowane z rozmaitego materiału od chorych, szczepy kliniczne, po 10 izolatów z następujących grup: *Enterobacter cloacae, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Proteus mirabilis + Proteus vulgaris, Acinetobacter baumannii, S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa.* Ponadto użyto wzorcowe szczepy grzybów: *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Stężenie ozonu w wodzie ozonowanej oznaczano metodą miareczkowania. Hodowle bakteryjne, na które działano ozonem prowadzono w formie planktonowej i w postaci biofilmów (tylko szczepy *S. aureus* i *P. aeruginosa*). Szczepy grzybów badano tylko w formie planktonowej.

W badaniach wody ozonowanej wykazano jej bardzo dużą aktywność biobójczą – wymagany przez normy czas kontaktu niezbędny do redukcji liczby komórek bakterii (o 5 log) i wegetatywnych komórek grzybów (o 4 log) jest bardzo krótki – 30 s lub 1 min. Natomiast wobec zarodników *A. brasiliensis*, tak krótki okres kontaktu okazał się niewystarczający. W badaniach gazowej mieszaniny tlenowo-ozonowej wykazano odpowiednią aktywność wobec bakterii w postaci planktonowej, ale dopiero po czasie kontaktu wynoszącym 2 minuty, jednakże należy zaznaczyć, że krótszego czasu nie można było zastosować z przyczyn technicznych.

W części doświadczalnej dotyczącej biofilmów bakteryjnych, biorąc pod uwagę wymagania norm PN-EN 1040 i PN-EN 1275, wykazano, że ozonowana woda może być uznana jako skuteczny środek niszczący biofilm bakteryjny. Biofilm *S. aureus* był bardziej wrażliwy na ozonowaną wodę (czas kontaktu 30 s) niż biofilm *P. aeruginosa*. Gazowa mieszanina tlenowo – ozonowa okazała się nieskuteczna w niszczeniu biofilmów bakteryjnych.

8. Posumowanie

Biorąc pod uwagę piśmiennictwo związane z badaniami aktywności przeciwdrobnoustrojowej, dzisiejszy stan wiedzy pozwala na traktowanie ozonoterapii jako metody opartej na faktach (EBM) w zakresie jej bakteriobójczych i grzybobójczych zastosowań. Inne zastosowania tej metody fizykalnej pozostają nadal, pomimo wielu badań, dyskusyjne.

Badania podstawowe i kliniczne nadal trwają, chociaż liczba ich nie jest zbyt wysoka. Obecnie (stan na 20 lipca 2012 r.) w największej, światowej medycznej bazie literaturowej PubMed, pod hasłem „ozone therapy" znajdowało się 2240 doniesień naukowych. Co zadziwiające wśród obowiązujących w PubMed słów kluczowych Medical Subject Headings (MeSH) nie ma do dzisiaj kategorii odnoszących się do stosowania ozonu jako czynnika bakteriobójczego i zastosowań ozonoterapii w chirurgii.

Piśmiennictwo

1. Agaev B.A., Agaev R.M., Gasymov R.Sh.: The method of biliary tracts drainage of patients with biliodigestive anastomosis at obstructive jaundice and acute cholangitis. *Khirurgiia* (*Mosk.*), **1**, 18–22 (2011)
2. Al-Jaziri A.A., Mahmoodi S.M.: Painkilling effect of ozone-oxygen injection on spine and joint osteoarthritis. *Saudi Med. J.* **29**, 553–557 (2008)
3. Antoszewski Z., Madej P.: Ozonoterapia i jej zastosowanie w medycynie. α-Medica Press Bielsko Biała, 1997
4. Antoszewski Z., Skowron J., Wachowski J., Urbańczyk L., Kulej J.: Krótka historia zastosowania ozonoterapii po raz pierwszy w polskiej medycynie oraz techniki stosowania ozonu u chorych oparzonych. *Medycyna 2000*, 23–24 (1992)
5. Antoszewski Z., Wieczorkiewicz B., Mandat K., Madej P., Gubała-Kacała M.: Podawanie mieszaniny tlenowo-ozonowej do bocznej komory mózgu w leczeniu powikłań po wszczepieniu zastawki Pudenza (w) Ozonoterapia i jej zastosowanie w medycynie, red. Antoszewski Z, Madej P., Bielsko Biała, α-medica press, 1997
6. Arita M., Nagayoshi M., Fukuizumi T., Okinaga T., Masumi S., Morikawa M., Kakinoki Y., Nishihara T.: Microbial efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol. Immunol*. **20**, 206–210 (2005)
7. Aubourg P.: Colibacillose Aigue, colibacillose Chronique: ameliorations Kliniki par notabli un traitement d'ozonowa. *Bull. Mem. Paris*, **140**, 644–645 (1936)
8. Bialka K.L., Demirci A.: Efficacy of aqueous ozone for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on raspberries and strawberries. *J. Food Prot.* **70**, 1088–1092 (2007)
9. Białoszewski D.: Zastosowanie ozonoterapii śródoperacyjnej jako profilaktyki zakażeń w chirurgii narządu ruchu ze szczególnym uwzględnieniem alloplastyk stawowych – doniesienie wstępne. *Ortop. Traum. Rehab.* **5, 6**, 781–786 (2003)
10. Białoszewski D.: Zastosowanie terapii ozonem do leczenia zakażeń w obrębie narządu ruchu (w) Leczenie zakażeń kości, red. Gaździk T, Urban & Partner, 2004, s. 411–422
11. Białoszewski D., Bocian E., Bukowska B., Czajkowska M., Sokół-Leszczyńska B., Tyski S.: Antimicrobial activity of ozonated water. *Med. Sci. Monitor*, **16**, MT71–75 (2010)
12. Białoszewski D., Kowalewski M.: Przydatność miejscowych, głębokich insuflacji mieszaniną ozonowo-tlenową w profilaktyce i leczeniu zakażeń w obrębie narządów ruchu. *Ortop. Traum. Rehab*. **3, 4**, 552–556 (2001)
13. Białoszewski D., Nowak P., Michalski P.: Przydatność terapii ozonem w leczeniu przewlekłych i pourazowych patologii w obrębie narządu ruchu. *Ortop. Traum. Rehab*. **4**, 47–49 (2000)
14. Białoszewski D., Pietruczuk-Padzik A., Kalicinska A., Bocian E., Czajkowska M., Bukowska B., Tyski S.: Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med. Sci. Monitor*, **17**, BR339–344 (2011)
15. Bocci V.: Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br. J. Biomed. Sci.* **56**, 270–279 (1999)
16. Bocci V.: Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation. *Kluwer Acad. Publ.* 2002
17. Bocci V.: Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **216**, 493–504 (2006)
18. Bonetti M., Fontana A., Martinelli F., Andreula C.: Oxygen--ozone therapy for degenerative spine disease in the elderly: a prospective study. *Acta Neurochir Suppl*. **108**, 137–142 (2011)
19. McCabe E.: The abbreviated history and suppression of ozone therapy in the USA. McCabe, 1994
20. Caliskan B., Guven A., Ozler M., Cayci T., Ozcan A., Bedir O., Surer I., Korkmaz A.: Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **71**, 473–480 (2011)
21. Cardoso M.G., de Oliveira L.D., Koga-Ito C.Y., Jorge A.O.: Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus*

faecalis, and endotoxins in root canals. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. **105**, e85–91 (2008)
22. Chen H., Xing B., Liu X., Zhan B., Zhou J., Zhu H., Chen Z.: Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* **581**, 306–314 (2008)
23. Emer Z., Akbas M.Y., Ozdemir M.: Bactericidal activity of ozone against *Escherichia coli* in whole and ground black peppers. *J. Food Prot.* **71**, 914–917 (2008)
24. Hertst R.F.: German law embraces alternative medicine. *New Scientist Magazine*, **3**, 256–258 (1997)
25. Huth K.C., Quirling M., Maier S., Kamereck K., Alkhayer M., Paschos E.: Effectiveness of ozone against endontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int. Endod. J.* **42**, 3–13 (2009)
26. Huttunen K., Kauhanen E., Meklin T., Vepsäläinen A., Hirvonen M.R., Hyvärinen A., Nevalainen A.: The effect of ozonization on furniture dust: microbial content and immunotoxicity in vitro. *Sci. Total. Environ*. **408**, 2305–2311 (2010)
27. Ikonomidis S., Tsaousis P., Fyntanis A., Iliakis E.M.: New data regarding the use of ozone therapy in the former Soviet Union countries. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia*, **4**, 40–43 (2005)
28. Iwanek P.: Biologiczne podstawy działania ozonu na florę jamy ustnej. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, **53**, supl. 3, 41–44 (2007)
29. Jacobs i wsp.: Untersuchung űber zwischenfalle und typische komplikationen in der ozon-sauerstoff-therapie. *Ozo Nachrichten*, **1**, 5 (1982)
30. Kenworth Ch..J.: Ozone. Florida Medical Association, 1885
31. Kim C., Hung Y.C.: Inactivation of *E. coli* O157:H7 on blueberries by electrolyzed water, ultraviolet light, and ozone. *J. Food. Sci.* **77**, M206-11 (2012)
32. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J. Korean Med. Sci.* **24**, 368–74 (2009)
33. Koseki S., Isobe S.: Effect of ozonated water treatment on microbial control and browning of iceberg lettuce (Lactuca sativa L.). *J. Food Prot.* **69**, 154–160 (2006)
34. Kuştarci A., Sümer Z., Altunbaş D., Koşum S.: Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an *ex vivo* study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **107**, e73–79 (2009)
35. Lelianov AD, Budrin VA, Novikov AS, Guseva ED, Nesterov AA, Kirsov PP. [Optimization of the treatment of stomach ulcer in patients subjected to perforated gastroduodenal ulcer closure], *Eksp. Klin. Gastroenterol.* **5**, 81–85 (2007)
36. Lenartowicz L.: Nowa najwszechstronniejsza metoda szybkiej sterylizacji niskotemperaturowej – 3M™ Optreoz™ 125-Z. *Zakażenia*, **3**, 18–21 (2012)
37. Macauley J.J., Quiang A., Adams C.D., Surampalli R., Mormile M.R.: Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res.* **40**, 2017–2026 (2006)
38. Mahapatra A.K., Muthukumarappan K., Julson J.L.: Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. **45**, 447–461 (2005)
39. Masini M., Calaça A.: Minimally invasive treatment for refractory low back pain, targeted by epidural endoscopy with O(2)/O(3) and steroid therapy. *Acta Neurochir. Suppl*. **108**, 33–37 (2011)
40. Muszański R.: Zastosowanie technologii ozonowania w przemyśle spożywczym i napojowym. *Agro. Przemysł*. **3**, 27–29 (2007)
41. Polydorou O., Pelz K., Hahn P.: Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding system. *Eur. J. Oral Sci.* **114**, 349–353 (2006)
42. Ponikowska I., Ferson D.: Nowoczesna medycyna uzdrowiskowa. MediPress, Wyd. I, Warszawa, 2009
43. Rokitanski O., Steiner J., Trubel W., Viebahn R., Washütt J.: Die ozontherapie bei peripheren i arteriellen durchblutungs-strörugen, Klinik i biochemische und blutgasanalytische untersuchung. Wasser IOA Ozon- Weltkongress, Berlin, 1981, s. 53–75
44. Rozporządzenie Ministra Środowiska z 17.12.2008 r. „w sprawie dokonywania oceny poziomów substancji w powietrzu" (w): Dz.U. 2009, nr 5, poz. 31.
45. Rubin M.B.: The history of ozone. The Schönbein period, 839–1868, *Bull. Hist. Chem*. **26**, 40–56 (2001)
46. Sechi L.A., Lezcano I., Nunez N., Espim M., Duprė I., Pinna A., Molicotti P., Fadda G., Zanetti S.: Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J. Appl. Microbiol*. **90**, 279–284 (2001)
47. Selma M.V., Beltran D., Allende A., Chacon-Vera E., Gil M.I.: Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. *Food Microbiol*. **24**, 492–499 (2007)
48. Selma M.V., Beltran D., Chacon-Vera E., Gil M.I.: Effect of ozone on the inactivation of *Yersinia enterocolitica* and the reduction of natural flora on potatoes. *J. Food Prot.* **69**, 2357–2363 (2006)
49. Skalska K., Ledakowicz S.: Rozwój dezynfekcji chemicznej – perspektywy wykorzystania ozonu. *Laboratorium*, **10**, 10–13 (2007)
50. Souza Y.M., Fontes B., Martins J.O., Sannomiya P., Brito G.S., Younes R.N., Rasslan S.: Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics* (*Sao Paulo*), **65**, 195–202 (2010)
51. Steppan J., Meaders T., Muto M., Murphy K.J.: A metaanalysis of the effectiveness and safety of ozone treatments for herniated lumbar discs. *J. Vasc. Interv. Radiol*. **21**, 534–548 (2010)
52. Stoker G.: The surgical uses of ozone. *Lancet*, II **21**, 712 (1916)
53. Szaflik J.: Ozon – wróg czy przyjaciel? *Biuletyn Informacyjny Stowarzyszenia Retina AMD Polska*, **1(4)**, (2001)
54. Shah P, Shyam AK, Shah S. Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. *Indian. J. Orthop*. **45**, 376–379 (2011)
55. Szmurło W., Ponikowska I.: Balneoozonoterapia – własna metoda lecznicza, metodyka, stosowanie. *Balneol. Pol*. **40**, 38–43 (1998)
56. Tesla N., Johnston B.: My inventions: The autobiography of Nicola Tesla, Hart Brothers, First edition, Williston, Vermont, 1982
57. Travagli V., Zanardi I., Valacchi G., Bocci V.: Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm*. 2010:610418. Epub 2010 July 4. doi: 10.1155/2010/610418 (2010)
58. Ventskovski ABM, Zhegulovich VG, Marchenko VV. [Surgical treatment of acute purulent inflammatory processes in the pelvic area] *Lik Sprava*, **5–6**, 76–82 (2007)
59. Vurma M., Pandit R.B., Sastry S.K., Yousef A.E.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and natural microbiota on spinach leaves using gaseous ozone during vacuum cooling and simulated transportation. *J Food Prot*. **72**, 1538–1546 (2009)
60. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Technol Ther.* **13**, 1255–1260 (2011)
61. Wolff A.: Eine medizinische verwendbarkeit des ozons. *Dtsch. Med. Wschr.* 311 (1915)
62. Wolff H.H.: Das medizinische ozon. Verlag für Medizin Heidelberg, 1979

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 185–190
http://www.pm.microbiology.pl

OPRYSZCZKOWE ZAPALENIE MÓZGU

Marta Popiel[1]*, Ewa Wietrak[1], Tomasz Laskus[1]

[1] Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa

Wpłynęło w lutym 2012 r.

1. Wstęp. 2. Wirusowe zapalenia mózgu. 3. Opryszczkowe zapalenie mózgu. 3.1. Epidemiologia. 3.2. Patogeneza. 3.3. Objawy kliniczne. 3.4. Diagnostyka. 3.4.1. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). 3.4.2. Badania serologiczne. 3.5. Leczenie. 4. Podsumowanie.

Herpes simplex encephalitis (HSE)

Abstract: Encephalitis is a severe neurological disease, usually caused by viral infection. Most cases of viral encephalitis have unclear etiology. Herpes simplex encephalitis (HSE) comprises about 10–20% of cases of viral encephalitis, and is the most common cause of encephalitis with known etiology. HSE is associated with 30% mortality in treated patients, while mortality in the untreated patients is as high as 70%. Rapid and correct diagnosis of HSE is essential for fast introduction of right treatment, which leads to significant reduction in mortality and lowers the risk of neurological complications.

1. Introduction. 2. Viral encephalitis. 3. Herpes simplex encephalitis. 3.1. Epidemiology. 3.2. Pathogenesis. 3.3. Clinical symptoms. 3.4. Diagnostics. 3.4.1. Polymerase Chain Reaction. 3.4.2. Serology. 3.5. Treatment. 4. Summary

Słowa kluczowe: HSV, opryszczkowe zapalenie mózgu, wirusowe zapalenie mózgu
Key words: herpes simplex encephalitis, HSV, viral encephalitis

1. Wstęp

Zapalenie mózgu (*encephalitis*), jest ciężkim zespołem neurologicznym przebiegającym z klinicznymi objawami zaburzenia czynności mózgu. Może być ono spowodowane zarówno czynnikami zakaźnymi, jak i niezakaźnymi. Do czynników niezakaźnych można zaliczyć m.in. choroby immunologiczne, sercowo-naczyniowe, metaboliczne czy też nowotworowe [37]. Większość przypadków jest jednak następstwem czynników zakaźnych wśród których dominują wirusy. Także bakterie oraz grzyby mogą być czynnikiem etiologicznym zapalenia mózgu [16, 19].

2. Wirusowe zapalenie mózgu

Wirusowe zapalenie mózgu jest najczęstszą przyczyną wszystkich zapaleń mózgu, a częstość jego występowania waha się w większości populacji od 3,5 do 7,4 przypadków na sto tysięcy osób [15]. Przykładowo, w Wielkiej Brytanii rocznie odnotowuje się ok. 700 przypadków wirusowego zapalenia mózgu [4], natomiast we Francji zachorowalność jest wyższa i sięga ok. 1200 przypadków rocznie [26]. Bardzo często etiologia zapaleń mózgu pozostaje nieznana – w dotychczas przeprowadzonych badaniach epidemiologicznych przyczyny zapaleń mózgu nie udało się ustalić w 31–75% przypadków [3, 4, 13–15, 21, 25, 31].

Dotychczas opisano ponad 100 wirusów, które mogą prowadzić do rozwoju zapalenia mózgu [9]. Najczęściej są to herpes wirusy, takie jak wirusy opryszczki (HSV-1 – *Herpes Simplex Virus* – 1); (HSV-2 – *Herpes Simplex Virus* – 2), wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV – *Varicella-Zoster Virus*), wirus mononukleozy (EBV – *Epstein-Barr Virus*), jak również enterowirusy (głównie enterowirus 71), arbowirusy jak wirus Zachodniego Nilu (WNV – *West Nile Virus*), wirus japońskiego zapalenia mózg (JE – *Japanese Encephalitis*) oraz wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV – *Tick-Borne Encephalitis Virus*) [1, 8, 9]. W ciągu ostatniej dekady, pojawiły się doniesienia o nowych wirusach mogących stanowić czynnik etiologiczny zapalenia mózgu. Należą do nich m.in. wirus Nipah (*Nipah Virus*), australijski lyssawirus nietoperzy (ABLV – *Australian bat lyssavirus,*) czy też wirus grypy A H5N1 [9, 14].

3. Opryszczkowe zapalenie mózgu

Wirusy HSV-1 i HSV-2 należą do α-herpes wirusów, których genom zbudowany jest z liniowego dsDNA. Materiał genetyczny wirusów otoczony jest kapsydem. Pomiędzy kapsydem a otoczką znajduje się warstwa

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa; tel. 0 602-757-148; e-mail: mszabl@wp.pl

białek, natomiast zewnętrzna część wirusa stanowi błona lipidowa na powierzchni której znajdują się glikoproteiny wirusowe [34].

HSV jest powszechnie występującym wirusem u populacji ludzkiej [46, 47], a częstość jego występowania zależy m.in. od czynników demograficznych. Zakażenia HSV-1 występują już we wczesnym okresie życia wśród rasy czarnej zamieszkującej USA i obecność swoistych przeciwciał stwierdza się u około 30% dzieci w wieku 5 lat i ok 70–80% nastolatków [46]. Wśród razy białej zamieszkującej USA zakażenie następuje w późniejszym wieku. Zakażenia HSV-2 w USA występują rzadziej i dotyczą 20–30% osób w wieku 15–29 lat, wzrastając do 35–60% u osób w wieku 60 lat [46].

HSV zakaża głównie skórę i błony śluzowe doprowadzając do charakterystycznych zmian pęcherzykowych. HSV-1 jest przenoszony drogą kropelkową lub przez kontakt bezpośredni. Typowe miejsce lokalizacji wirusa to jama ustna, gardło, skóra górnej połowy ciała (najczęściej twarzy) oraz rogówka. Nabycie zakażenia HSV-2 jest natomiast zwykle następstwem transmisji wirusa za pośrednictwem narządów płciowych i głównie obejmuje drogi moczowo-płciowe, odbyt oraz skórę dolnej połowy ciała [45–47].

Po pierwotnym zakażeniu HSV może przechodzić w stan latencji, co jest wspólną i charakterystyczną cechą wszystkich herpes wirusów. Utajenie HSV zachodzi w neuronach zwojów czuciowych rdzenia kręgowego (najczęściej zwoju nerwu trójdzielnego i nerwów krzyżowych), a także w neuronach czuciowych w ośrodkowym układzie nerwowym [34]. Dzięki temu HSV może przetrwać w organizmie gospodarza przez całe jego życie a kolejne objawy zakażenia mogą pojawiać się w innym miejscu co pierwotne. HSV może czasami powodować nietypowe zakażenia zapalenie wątroby, płuc, przełyku, odbytnicy, rumień wielopostaciowy czy też zapalenia mózgu [22, 24, 39, 40, 46].

3.1. Epidemiologia

W przeciągu ostatnich lat przeprowadzono kilkanaście badań epidemiologicznych dotyczących zapaleń mózgu. W większości z nich, najczęściej stwierdzanym czynnikiem etiologicznym był HSV. Dokładna częstość występowania opryszczkowego zapalenia mózgu (HSE – *Herpes Simplex Encephalitis*) nie jest znana, szacuje się, że może wynosić od 1 do 4 przypadków na milion osób rocznie [30, 44]. Według niektórych danych, HSE stanowi 10–20% wszystkich wirusowych zapaleń mózgu [24, 32, 39], chociaż inne dane wskazują na jeszcze większą częstość jego występowania (Tabela I).

Większość przypadków HSE spowodowana jest przez HSV-1, który uważany jest za najczęstszy znany czynnik etiologiczny zapaleń mózgu u osób dorosłych i starszych dzieci [20, 22, 34]. Natomiast ok. 10% HSE może być wywołana przez HSV-2, który powoduje prze-

Tabela I

Występowanie HSE w etiologicznych badaniach mózgu

L.p.	Kraj [piśmiennictwo]	Czas trwania obserwacji	Zapalenia mózgu (n)	Wirusowe zapalenia mózgu (n)	HSE (n)	% zapaleń mózgu	% wirusowych zapaleń mózgu
1.	Finlandia [28]	1973–1987	95 (d)	58	7	7,4%	12,1%
2.	Finlandia [29]	1967–1991	322 (D)	134	53	16,5%	39,6%
3.	Słowacja [3]	1979–1991	170 (d)	107	17	10,0%	15,9%
4.	USA [21]	1988–1997	186 804 (D + d)	28 930	21 507	11,5%	74,3%
5.	Wielka Brytania [4]	1989–1998	6 414 (D + d)	2 574	1 419	22,1%	55,1%
6.	Szwecja [35]	1992–1996	27 (D)	14	10	37%	71,4%
7.	USA – Kalifornia [36]	1990–1999	17 318 (D + d)	– – –	2007	11,6%	– – –
8.	Australia [17]	1990–2007	5 926 (D + d)	– – –	763	12,9%	– – –
9.	USA – Kalifornia [12]	1998–2000	334 (D + d)	31	11	3,3%	35,5%
10.	Francja [38]	1991–2002	32 (d)	– – –	6	18,8%	– – –
11.	Finlandia [23]	1999–2003	42 (D)	15	4	9,5%	26,7%
12.	USA – Kalifornia [13]	1998–2005	1 570 (D + d)	170	45	2,9%	26,5%
13.	Syria [18]	2005	106 (D + d)	106	32	30,2%	30,2%
14.	Grecja [10]	2003–2006	45 (D)	8	4	8,9%	50,0%
15.	Wielka Brytania [14]	2005–2006	203 (D + d)	– – –	38	18,7%	– – –
16.	Francja [25]	2007	253 (D + d)	90	55	21,7%	61,1%
17.	Grecja [11]	2005–2008	42 (d)	– – –	10	23,8%	– – –

HSE – opryszczkowe zapalenie mózgu; D – dorośli; d – dzieci; n – ilość przypadków

ważnie łagodnie przebiegające limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, rdzenia kręgowego czy też zapalenia korzeni nerwowych [47]. Stwierdzono również, że HSV-2 stanowi najczęstszą przyczynę HSE wśród noworodków. W tym przypadku transmisja wirusa następuje wertykalnie podczas porodu [22, 27, 46].

Występowanie opryszczkowego zapalenia mózgu jest niezależne od takich czynników jak płeć czy też pora roku, natomiast zależy od wieku pacjenta. W 30% przypadków zapalenie rozwija się u osób poniżej 20 r.ż. (z wyjątkiem niemowląt), a w 50% u osób powyżej 50 r.ż. [44]. Najwyższy odsetek zachorowań stwierdza się pomiędzy 60 a 64 r.ż. [34, 44].

Zapalenie mózgu wywołane przez HSV-1, mimo rzadkości występowania, uważane jest za jedną z najpoważniejszych chorób wirusowych układu nerwowego. Odsetek zgonów w przypadku pacjentów z prawidłowo wdrożonym leczeniem sięga 30%, natomiast w przypadku pacjentów nie leczonych osiąga aż 70% co uzasadnia konieczność szybkiego rozpoczęcie leczenia pacjentów ze stwierdzonym HSE [24, 34, 40]. U znacznej części chorych HSE pozostawia jednak trwałe zaburzenia neurologiczne, a tylko 2–5% pacjentów powraca do pełnego zdrowia [40].

3.2. Patogeneza

Przyczyną HSE może być zarówno pierwotne, jak i wtórne zakażenie HSV. Pierwotne zakażenie stanowi przyczynę ok. 30% zapaleń mózgu i najczęściej przebiega bezobjawowo. W większości przypadków spowodowane jest przez HSV-2 i obserwuje się je głównie u osób poniżej 18 r.ż. [34, 39].

Po pierwotnie przebytym zakażeniu HSV ulega latencji w ośrodkowym układzie nerwowym. Reaktywacja wirusa może następować m.in. pod wpływem stresu, gorączki, promieniowania UV, promieniowania rentgenowskiego, czy też urazu [39, 44]. Uważa się zatem, że większość przypadków zapaleń mózgu wywołanych przez HSV-1 jest wynikiem reaktywacji wirusa przebywającego w stanie latencji [39]. Częstość występowania tego typu zakażeń jest jednak niewspółmiernie niska w porównaniu do powszechnego występowania wirusa w stanie latencji w zwojach nerwowych zdrowych ludzi. Przyczyna tego stanu rzeczy nie jest jasna. Mechanizm, który aktywuje rozwój HSE także nie jest do końca poznany, ale wiadomo, że możliwe jest kilka dróg rozwoju wtórnego zakażenia HSV. Jednym z nich jest reaktywacja wirusa w układzie nerwowym, w miejscu gdzie pozostawał w stanie latencji. Innym możliwy mechanizm zakłada migrację wirusa bądź to wzdłuż włókien nerwu trójdzielnego, bądź wzdłuż włókien węchowych ze zwojów nerwu trójdzielnego. W zależności od miejsca reaktywacji, a następnie migracji wirusa zmiany zapalne mogą być różnie zlokalizowane [1, 22, 34, 47].

3.3. Objawy kliniczne

Przebieg HSE może być łagodny, ale najczęściej ma charakter gwałtowny i może prowadzić do śmierci [34]. Przebieg zakażenia uzależniony jest również od poziomu odporności. Osoby z obniżoną odpornością, wynikającą zarówno z chorób towarzyszących (np. pacjenci po przeszczepach, chorzy z AIDS), jak również kobiety w ciąży, są bardziej narażeni na HSE, zwłaszcza o ciężkim przebiegu [19].

Opryszczkowe zapalenie mózgu objawia się gorączką, bólem głowy, sztywnością karku w połączeniu z zaburzeniami mózgowymi takimi jak zmiany świadomości, osobowości, zachowania oraz ogniskowymi objawami neurologicznymi [34]. Gorączka występuje w 90% przypadków, a jej brak powinien wzbudzać wątpliwości co do prawidłowo postawionej diagnozy. Napady padaczkowe, zarówno ogniskowe, jak i uogólnione pojawiają się u 70% pacjentów z potwierdzoną chorobą [39]. Tylko 25% pacjentów z HSE ma opryszczkowe zmiany skórne, a zatem ich brak nie może stanowić kryterium wykluczenia diagnozy [20].

Zdarzają się również HSE o objawach ograniczonych do gorączki, które charakteryzują się łagodnym przebiegiem. Mogą one być spowodowane zarówno przez HSV-1, jak i HSV-2. Ocenia się, że takie formy zapalenia mózgu mogą stanowić do 20% wszystkich przypadków HSE, co podkreśla znaczenie wykonywania badań potwierdzających obecność wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z gorączką, nawet w przypadku braku pleocytozy płynu mózgowo-rdzeniowego lub ogniskowych objawów neurologicznych [2].

3.4. Diagnostyka

Historycznie, w diagnostyce opryszczkowego zapalenia mózgu, w przypadku wątpliwości klinicznych, biopsja mózgu była badaniem rozstrzygającym. Metoda ta charakteryzuje się zarówno wysoką czułością (99%), jak i swoistością (100%); [16]. Aktualnie istotną rolę odgrywają metody obrazowe: przede wszystkim rezonans magnetyczny (MRI), tomografia komputerowa (CT), ewentualnie elektroencefalografia (EEG); [5, 33]. Poza technikami neuroradiologicznymi, diagnostyka pacjentów opiera sie na metodach laboratoryjnych. Nieprawidłowości w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) występują u 95% pacjentów. U chorych na HSE stwierdza się w PMR umiarkowaną limfocytarną pleocytozę oraz zwiększoną ilość białka [5, 9, 24]. Niewielki procent pacjentów (3–5%) z ciężkim wirusowym zapaleniem mózgu (w tym z opryszczkowym zapaleniem mózgu) może mieć całkowicie prawidłowe parametry płynu mózgowo-rdzeniowego i najczęściej zdarza się to na początku trwania choroby [24, 44]. Połączenie metod neuroradiologicznych oraz badań płynu

mózgowo-rdzeniowego stanowi podstawę prawidłowego rozpoznania zapalenia mózgu.

3.4.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

Techniki biologii molekularnej zrewolucjonizowały diagnostykę pacjentów z HSE. Jest to jedna z pierwszych infekcji centralnego układu nerwowego, dla której do diagnostyki rutynowej wprowadzono metody wykrywające DNA wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym przy pomocy PCR [44]. Metoda ta obecnie jest „złotym standardem" w diagnostyce HSE i jest znacznie mniej inwazyjna niż biopsja mózgu [6]. Niemniej jednak dotychczas nie ma zgody co do standaryzacji wykonywania samego testu, w tym analizowanego regionu wirusa, warunków reakcji czy też stosowanych starterów (primerów) [1]. Określenie liczby kopii wirusa może być wykładnikiem ciężkości przebiegu choroby, co uzasadnia potrzebę użycia ilościowych metod w diagnostyce HSE [1].

PCR z płynu mózgowo-rdzeniowego charakteryzuje się bardzo dużą czułością (96–98%) i swoistością (95–99%) u osób dorosłych, natomiast u noworodków i niemowląt zarówno czułość jak i swoistość są mniejsze [37]. Materiał genetyczny wirusa w 80% badanych próbek utrzymuje się ponad tydzień od rozpoczęcia leczenia przeciwwirusowego [39]. Prawdopodobieństwo uzyskania fałszywie ujemnego wyniku w przypadku HSE jest niewielkie [6]. Może być to spowodowane zbyt wczesnym (pierwsze 24–48 godzin) lub zbyt późnym (po 10–14 dniach) pobraniem płynu mózgowo-rdzeniowego [2]. Dlatego też, w przypadku uzyskania negatywnego wyniku na początku choroby, zaleca się po 4 dniach powtórne pobranie PMR i wykonanie PCR. Inną przyczyną negatywnego wyniku PCR może być zbyt niski poziom wirusa w PMR. Chociaż jego replikacja następuje głównie w mózgu, to do płynu mózgowo-rdzeniowego uwalniana jest niewielka ilość wirionów [7]. Dlatego też interpretacja wyników PCR musi być skorelowana z obrazem klinicznym.

3.4.2. Badania serologiczne

Rola badań serologicznych w diagnostyce HSE jest ograniczona, zwłaszcza u starszych dzieci i u osób dorosłych. Związane jest to z obecnością przeciwciał anty-HSV u pacjentów z nawracającymi zakażeniami, które to zakażenia są przyczyną aż połowy HSE [22]. Przeciwciała anty-HSV w trakcie infekcji pierwotnej pojawiają się zwykle późno, natomiast ich wzrost w trakcie nawracających infekcji nie zawsze występuje. Oznaczanie przeciwciał w surowicy krwi jest mało użyteczne, zwłaszcza w pierwszych dniach choroby, chociaż ich czterokrotny wzrost może sugerować etiologię HSV [22]. Jeśli stosunek pomiędzy mianem przeciwciał w surowicy krwi i PMR jest ≤20, to sugeruje to ich produkcję w centralnym układzie nerwowym [33]. Podwyższone miano przeciwciał w PMR zwykle występuje po 10–12 dniach od wystąpienia objawów klinicznych [1]. Powyższe ograniczenie powoduje, że oznaczanie przeciwciał anty-HSV nie może być główną metodą rozpoznawania zakażenia HSV i stosowane jest głównie jako uzupełniająca metoda diagnostyczna lub też do retrospektywnej oceny zakażenia [22, 24].

3.5. Leczenie

W przypadku podejrzenia HSE zaleca się leczenie przeciwwirusowe zanim jeszcze nastąpi potwierdzenie obecności czynnika etiologicznego. Najczęściej leczenie rozpoczyna się wyłącznie na podstawie objawów klinicznych, co jest podyktowane dużą śmiertelnością i ilością powikłań w przypadku opóźnienia rozpoczęcia terapii.

HSE jest jednym z pierwszych zakażeń centralnego układu nerwowego, w którym dostępne jest relatywnie skuteczne leczenie [44]. Lekiem z wyboru stosowanym w opryszczkowym zapaleniu mózgu wywołanym zarówno przez HSV-1, jak i HSV-2, jest acyklowir będący analogiem nukleozydu 2'-deoksyguanozyny. Acyklowir po wprowadzeniu do komórki za pomocą białka transportującego ulega fosforylacji w wyniku czego powstaje difosforan i trifosforan acyklowiru. Wirusowa polimeraz wprowadzając do DNA wirusa trifosforan acyklowiru zamiast trifosforanu deoksyguanozyny inaktywuje polimerazę DNA wirusa przez co ogranicza lub uniemożliwia dalszą syntezę wirusa [41, 42].

Wczesne wdrożenie acyklowiru u pacjentów z HSE zwiększa efektywność leczenia oraz zmniejsza zarówno śmiertelność o 20–30% [41, 42] jak i ilość powikłań [2]. Efektywność leczenia HSE zależna jest od długości trwania zapalenia mózgu oraz wieku pacjenta. Jednak po leczeniu powrót do pełnego stanu zdrowia występuje zaledwie u ok. 10% pacjentów [47]. U większości chorych pozostają trwałe zaburzenia neurologiczne takie jak zaburzenia intelektualne, neuropsychiatryczne, zaburzenia pamięci czy też padaczka [47].

Po zakończeniu leczenia zdarzają się przypadki nawrotu zakażenia HSV, co ma miejsce w przypadku 5% pacjentów i dotyczy głównie osób, u których leczenie prowadzono zbyt krótko [44].

Mimo, że acyklowir jest lekiem pierwszego rzutu, poszukuje się nowych, skuteczniejszych metod leczenia wirusowych zapaleń mózgu. Związane jest to z niesatysfakcjonującą efektywnością leczenia, wynikającą m.in. ze słabego przenikania leku do centralnego układu nerwowego na skutek jego ograniczonych właściwości lipofilnych [43].

4. Podsumowanie

Opryszczkowe zapalenie mózgu charakteryzuje się wysoką śmiertelnością, a u pacjentów, którzy przeżyli obserwuje się trwałe następstwa neurologiczne. Ponieważ nieleczone HSE doprowadza do zgonu aż u 70% pacjentów, leczenie, którego efektem jest ograniczenie trwałych następstw neurologicznych oraz wyraźne zmniejszenie śmiertelności pacjentów powinno być wdrożone możliwie jak najszybciej. Z kolei dla szybkiego rozpoznania HSE konieczne jest wdrożenie tanich, czułych i szybkich metod diagnostycznych.

Mimo upływu wielu lat i wdrożenia nowych technik diagnostycznych, m.in. PCR, umożliwiających określenie czynnika etiologicznego, zachorowalność i śmiertelność wśród pacjentów z HSE nadal pozostaje wysoka. W wielu krajach, również w Polsce, nie prowadzi się rejestru przypadków zapaleń mózgu, w tym także spowodowanych przez HSV. Istnieje potrzeba zwiększenia ogólnej świadomości dotyczącej zakażeń centralnego układu nerwowego tym wirusem co mogłoby doprowadzić do poprawy diagnostyki i efektywności leczenia.

Piśmiennictwo

1. Bloch K.C., Glaser C.: Diagnostic approaches for patients with suspected encephalitis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **9**, 315–322 (2007)
2. Chaudhuri A., Kennedy P.G.: Diagnosis and treatment of viral encephalitis. *Postgrad. Med. J.* **78**, 575–583 (2002)
3. Cizman M., Jazbec J.: Etiology of acute encephalitis in childhood in Slovenia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **12**, 903–908 (1993)
4. Davison K.L., Crowcroft N.S., Ramsay M.E., Brown D.W., Andrews N. J.: Viral encephalitis in England, 1989–1998: what did we miss? *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 234–240 (2003)
5. De Tiege X., Rozenberg F., Heron B.: The spectrum of herpes simplex encephalitis in children. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **12**, 72–81 (2008)
6. DeBiasi R.L., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Weinberg A., Tyler K.L.: Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* **25**, S5–S11 (2002)
7. Denes E., Labach C., Durox H., Adoukonou T., Weinbreck P., Magy L., Ranger-Rogez S.: Intrathecal synthesis of specific antibodies as a marker of herpes simplex encephalitis in patients with negative PCR. *Swiss. Med. Wkly.* **140**, 13107 (2010)
8. Donoso Mantke O., Vaheri A., Ambrose H., Koopmans M., de Ory F., Zeller H., Beyrer K., Windorfer A., Niedrig M.: Analysis of the surveillance situation for viral encephalitis and meningitis in Europe. *Euro. Surveill.* **13**, 1–10 (2008)
9. Ferrari S., Toniolo A., Monaco S., Luciani F., Cainelli F., Baj A., Temesgenm Z., Vento S.: Viral Encephalitis: Etiology, Clinical Features, Diagnosis and Management. *Open. Infect. Dis. J.* **3**, 1–12 (2009)
10. Frantzidou F., Kamaria F., Dumaidi K., Skoura L., Antoniadis A., Papa A.: Aseptic meningitis and encephalitis because of herpesviruses and enteroviruses in an immunocompetent adult population. *Eur. J. Neurol.* **15**, 995–997 (2008)
11. Galanakis E., Tzoufi M., Katragkou A., Nakou I., Roilides E.: A prospective multicenter study of childhood encephalitis in Greece. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, 740–742 (2009)
12. Glaser C.A., Gilliam S., Schnurr D., Forghani B., Honarmand S., Khetsuriani N., Fischer M., Cossen C.K., Anderson L.J.: In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998–2000. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 731–742 (2003)
13. Glaser C.A., Honarmand S., Anderson L.J., Schnurr D.P., Forghani B., Cossen C.K., Schuster F.L., Christie L.J., Tureen J.H.: Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1565–1577 (2006)
14. Granerod J., Crowcroft N.S. i wsp.: Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet. Infect. Dis.* **10**, 835–844 (2010) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
15. Granerod J., Crowcroft N.S.: The epidemiology of acute encephalitis. *Neuropsychol. Rehabil.* **17**, 406–428 (2007)
16. Granerod J., Crowcroft N.S.: Causality in acute encephalitis: defining aetiologies. *Epidemiol. Infect.* **138**, 783–800 (2010) (praca stanowi dzieło 15 autorów)
17. Huppatz C., Durrheim D.N., Levi C., Dalton C., Williams D., Clements M.S., Kelly P.M.: Etiology of encephalitis in Australia, 1990–2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1359–1365 (2009)
18. Ibrahim A.I., Obeid M.T., Jouma M.J., Roemer K., Mueller-Lantzsch N., Gartner B.C.: Prevalence of herpes simplex virus (types 1 and 2), varicella-zoster virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 and 7 DNA in cerebrospinal fluid of)Middle Eastern patients with encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4172–4174 (2005)
19. Kennedy P.G.: Viral encephalitis. *J. Neurol.* **252**, 268–272 (2005)
20. Kennedy P.G., Chaudhuri A.: Herpes simplex encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **73**, 237–238 (2002)
21. Khetsuriani N., Holman R.C., Anderson L.J.: Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988–1997. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 175–182 (2002)
22. Kimberlin D.W.: Herpes simplex virus infections of the central nervous system. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **14**, 83–89 (2003)
23. Kupila L., Vuorinen T., Vainionpaa R., Hukkanen V., Marttila R.J., Kotilainen P.: Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*, **66**, 75–80 (2006)
24. Levitz R.E.: Herpes simplex encephalitis: a review. *Heart. Lung.* **27**, 209–212 (1998).
25. Mailles A., Stahl J. P.: Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1838–1847 (2009).
26. Mailles A., Vaillant V., Stahl J.P.: Infectious encephalitis in France from 2000 to 2002: the hospital database is a valuable but limited source of information for epidemiological studies. *Med. Mal. Infect.* **37**, 95–102 (2007)
27. Nahmias A.J., Whitley R.J., Visintine A.N., Takei Y., Alford C.A.Jr.: Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J. Infect. Dis.* **145**, 829–836 (1982)
28. Rantala H., Uhari M.: Occurrence of childhood encephalitis: a population-based study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**, 426–430 (1989)
29. Rantalaiho T., Farkkila M., Vaheri A., Koskiniemi M.: Acute encephalitis from 1967 to 1991. *J. Neurol. Sci*. **184**, 169–177 (2001)
30. Schmutzhard E.: Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J. Neurol.* **248**, 469–477 (2001)
31. Sivertsen B., Christensen P.B.: Acute encephalitis. *Acta. Neurol. Scand.* **93**, 156–159 (1996)
32. Stahl J.P., Mailles A., Dacheux L., Morand P.: Epidemiology of viral encephalitis in 2011. *Med. Mal. Infect*. **41**, 453–464 (2011)
33. Steiner I., Budka H., Chaudhuri A., Koskiniemi M., Sainio K., Salonen O., Kennedy P. G.: Viral meningoencephalitis: a review

of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur. J. Neurol.* **17**, 999–1009 (2010)
34. Steiner I., Kennedy P.G., Pachner A.R.: The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet. Neurol.* **6**, 1015–1028 (2007)
35. Studahl M., Bergstrom T., Hagberg L.: Acute viral encephalitis in adults-a prospective study. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**, 215–220 (1998)
36. Trevejo R.T.: Acute encephalitis hospitalizations, California, 1990–1999: unrecognized arboviral encephalitis? *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1442–1449 (2004)
37. Tunkel A.R., Glaser C.A., Bloch K.C., Sejvar J.J., Marra C.M., Roos K.L., Hartman B.J., Kaplan S.L., Scheld W.M., Whitley R.J.: The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 303–327 (2008)
38. Vial C., Pozzetto B., Essid A., Stephan J.L., Chabrier S.: Acute encephalitis: report on 32 consecutive pediatric cases observed in one hospital. *Med. Mal. Infect.* **37**, 208–214 (2007)
39. Whitley R.J.: Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res.* **71**, 141–148 (2006)
40. Whitley R.J.: Herpes simplex virus infections of the central nervous system. Encephalitis and neonatal herpes. *Drugs*, **42**, 406–427 (1991)
41. Whitley R.J.: Viral encephalitis. *N. Engl. J. Med.* **323**, 242–250 (1990)
42. Whitley R.J., Alford C.A., Hirsch M.S., Schooley R.T., Luby J.P., Aoki F.Y., Hanley D., Nahmias A.J., Soong S.J.: Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N. Engl. J. Med.* **314**, 144–149 (1986)
43. Whitley R. J., Gnann J. W.: The incidence and severity of herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990–2001. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 881–882 (2007)
44. Whitley R.J., Gnann J.W.: Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet,* **359**, 507–513 (2002).
45. Whitley R.J., Kimberlin D.W.: Herpes simplex encephalitis: children and adolescents. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **16**, 17–23 (2005)
46. Whitley R.J., Roizman B.: Herpes simplex virus infections. *Lancet,* **357**, 1513–1518 (2 001)
47. Zajkowska J.M., Hermanowska-Szpakowicz T., Pancewicz S.A., Kondrusik M, Grygorczuk S.: [Herpes simplex encephalitis]. *Pol. Neurolog. Rev.* **2**, 22–26 (2006)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 191–201
http://www.pm.microbiology.pl

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK WIRUSA EPSTEINA-BARR – ICH UDZIAŁ W ZAKAŻENIU LATENTNYM I POWIĄZANIE Z PROCESAMI NOWOTWORZENIA

Anna Żuk-Wasek*

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Perspektywa historyczna. 3. Budowa genomu. 4. Zakażenie pierwotne – mechanizmy wnikania wirionów i replikacji EBV. 5. Molekularne podstawy zakażenia latentnego EBV. 6. Białka fazy latentnej. 7. Reaktywacja zakażenia latentnego. 8. Wirusowe homologi białek komórkowych. 9. Właściwości onkogenne EBV. 10. Nowotwory powiązane z EBV. 11. Podsumowanie

Characterization of Epstein-Barr virus proteins – their participation in latency and relation to oncogenesis

Abstract: Although the Epstein-Barr virus (EBV) infects more than 90% of the human population, the infection can have a broad range of health consequences. The primary infection usually occurs during childhood, without any symptoms or with a mild illness. During adolescent infection mononucleosis occurs in around 50% of individuals. This most extensively studied gammaherpesvirus is also associated with various human malignancies such as Hodgkin`s and non-Hodgkin`s lymphomas, Burkitt`s lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, AIDS-related lymphoproliferative disorders and X-linked lymphoproliferative disorder (Duncan`s disease). All these tumors are associated with the EBV latency cycle. Latently infected lymphocytes express the six nuclear antigens (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C and -LP), three latent membrane proteins (LMP-1, -2A and -2B) and small, non-polyadenylated RNAs (EBER-1 and EBER-2). EBV can transform and immortalise resting B-cells in cultures, which suggests that it may have oncogenic specificity. EBV has broad spectrum of proteins, which mimic cellular proteins regulating cell cycle (BCRF-1, BDLF-2, BARF-1 and BHRF-1). These proteins interact with or exhibit homology to a wide variety of antiapoptotic molecules, cytokines and signal transducers, hence promoting EBV infection, immortalization and transformation.

1. Introduction. 2. Historical perspectives. 3. Genome structure. 4. Primary infection-mechanisms of virion invasion and EBV replication. 5. Molecular aspects of latent EBV infection. 6. Latent proteins. 7. Reactivation from latency. 8. Viral homologues of cellular proteins. 9. Oncogenic properties of EBV. 10. Cancers connected with EBV. 11. Summary

Słowa kluczowe: białka latentne, EBV, latencja, nowotwory
Key words: Latent proteins, EBV, latency, cancers

1. Wprowadzenie

Wirus herpes typu 4 (HHV-4), powszechnie nazywany od nazwisk odkrywców wirusem Epsteina-Barr (EBV), należy do podrodziny *Gammaherpesvirinae*, rodziny *Herpesviridae*. Wspólną cechą tej rodziny jest zdolność ustalania latencji w komórkach gospodarza. Podrodzina gammaherpeswirusów, do której oprócz EBV należy także herpeswirus typu 8 (HHV-8) wyróżnia się nie tylko zdolnością do ustalania latencji w limfocytach, lecz także zdolnością do pobudzenia ich proliferacji [74]. Znane są dwa podtypy wirusa herpes typu 4: EBV-1 i EBV-2 różniące się między sobą regionem kodującym antygen jądrowy wirusa Epsteina-Barr (EBNA). Istnieje różnica w lokalizacji geograficznej obu typów wirusa: EBV-1 jest częściej spotykany i dominuje w Europie, EBV-2 wyodrębniony został w Afryce Centralnej i w Nowej Gwinei [27, 90].

Według różnych źródeł zakażonych EBV jest 90–95%, a w krajach rozwijających się nawet 100% populacji. Zakażenie najczęściej szerzy się drogą kropelkową, rzadziej przez przetoczenie preparatów krwiopochodnych i przeszczepy. Okres inkubacji wynosi 30–50 dni [62].

2. Perspektywa historyczna

W 1958 roku Denis Burkitt prowadził w Afryce badania nad nowotworem rozwijającym się u dzieci mieszkających w rejonach dotkniętych malarią. W swojej pracy wysunął śmiałą na owe czasy hipotezę, że czynnikiem etiologicznym tego chłoniaka może być wirus [7]. W 1961 roku z pracą tą zapoznał się patolog i ekspert mikroskopii elektronowej Michael Epstein. W 1963 roku otrzymał on z Ugandy próbki a w 1964 Michael Epstein i Yvonne Barr wyprowadzili z biopsji chłoniaka Burkitta (BL) linię komórkową i odkryli w niej wirusa, który od ich nazwisk został nazwany wirusem Epsteina-Barr [20, 21]. W surowicach osób chorych na BL stwierdzono również wyższy

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 0(22) 54-21-230, e-mail: azuk@pzh.gov.pl

poziom przeciwciał przeciwko EBV niż u osób zdrowych. W 1968 roku H e n l e wykazał związek pomiędzy zakażeniem EBV a mononukleozą zakaźną [36]. W tym samym roku Pope udowodnił, że EBV może unieśmiertelniać limfocyty ludzkie [68]. W 1975 roku w komórkach chłoniaka Burkitta i raka jamy nosowo-gardłowej (NPC) metodą hybrydyzacji wykryto obecność DNA EBV [63]. Dzięki tym eksperymentom oraz doświadczalnemu wywołaniu chłoniaków u naczelnych poprzez zakażenie ich wirusem Epsteina-Barr udowodniono, że EBV jest wirusem powiązanym z rozwojem nowotworów. Było to pierwsze odkrycie wykazujące udział wirusa w procesie powstawania nowotworów [80]. Obecnie EBV uważany jest również za istotny czynnik ryzyka w rozwoju raka jamy nosowo-gardłowej, oraz innych chorób nowotworowych układu krwiotwórczego.

3. Budowa genomu

Wirus Epsteina-Barr zbudowany jest z ikosahedralnego kapsydu składającego się ze 162 kapsomerów, o średnicy około 100 nm, który okrywa dwuniciową cząsteczkę kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Kapsyd otoczony jest tegumentem czyli wnikającą między kapsomery warstwą białkową i osłonką, którą tworzy podwójna warstwa lipidowa z glikoproteinami (Rys. 1A). Osłonka zawiera antygeny, które wiążą swoiste przeciwciała neutralizujące wirusa i często również receptor dla Fc fragmentu immunoglobuliny.

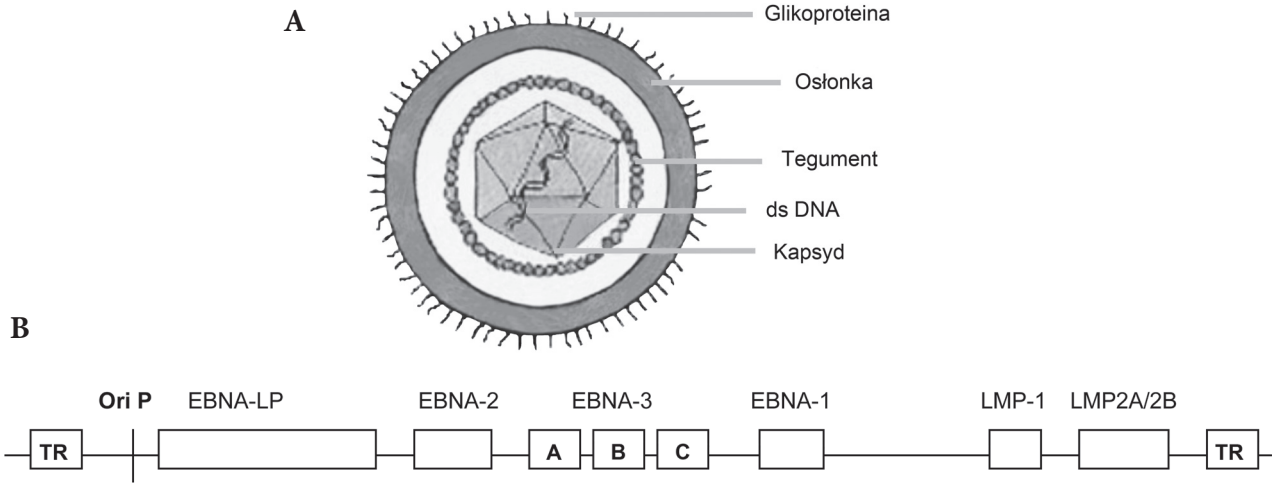
Genom EBV to cząstka linearnego, dwuniciowego DNA, długości 172 kbp, kodującego ponad 85 genów (Rys. 1B). Składa się z sekwencji krótkiej i długiej, zawierającej fragmenty powtórzone, sekwencje wewnętrznie powtórzone i terminalne.

Po fuzji z komórką gospodarza nukleokapsyd uwalniany jest do cytoplazmy a materiał genetyczny transportowany do jądra komórkowego. W zakażonej komórce genom wirusa przyjmuje zazwyczaj formę pozachromosomalnego, kolistego episomu, ale czasami może też ulegać integracji z chromosomami w formie linearnego DNA. Forma episomalna związana jest z fazą latentną, liniowa z fazą lityczną wirusa [47, 73].

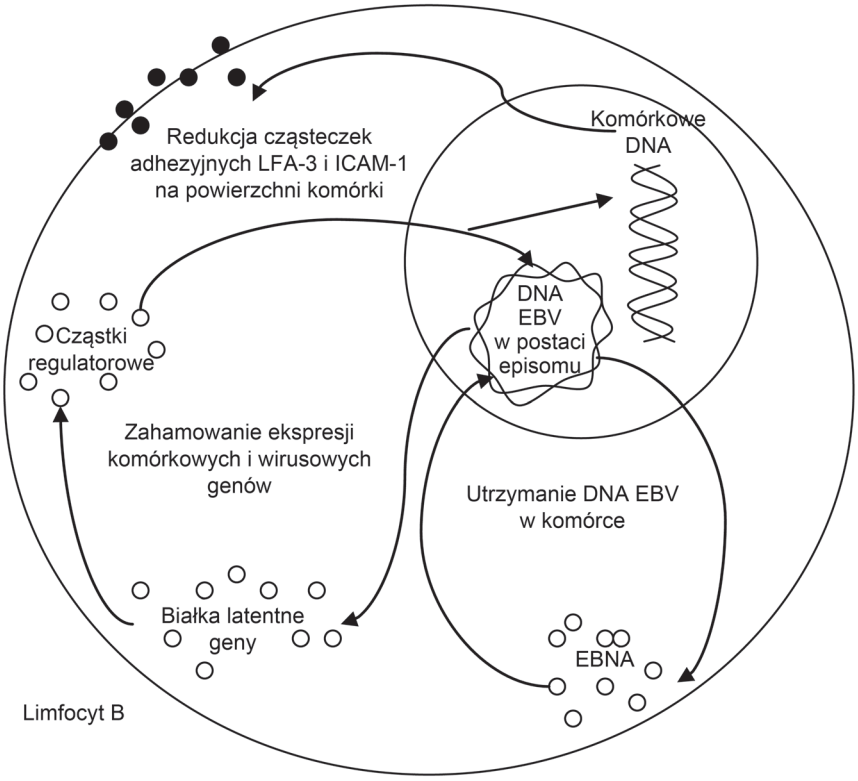
4. Zakażenie pierwotne – mechanizmy wnikania wirionów i replikacji EBV

Zakażenie pierwotne zaczyna się w jamie nosowo-gardłowej. Następuje tam fuzja wirionów z komórkami epitelialnymi oraz limfocytami B. Rzadziej wirus zakaża limfocyty T bądź komórki NK (natural killer) [89]. Do limfocytów B wirus wnika do komórki łącząc się białkami osłonki: gp350 i gp220 z receptorem komórkowym CD21, który jest także receptorem składowej dopełniacza C3d. Chociaż część limfocytów T może prezentować CD21 to jednak mechanizm wnikania do komórek T i NK nie jest do końca wyjaśniony. Komórki epitelialne nie posiadają w ogóle receptora CD21, zatem EBV musi wykorzystywać inny receptor [47, 48]. Proces ten jest przedmiotem wielu badań i pojawiają się doniesienia o wykorzystaniu jako alternatywnej drogi wnikania do komórek epitelialnych między innymi receptora IgA, Czy wykorzystania kompleksu glikoproteinowego gHgL do wiązania integryny αvβ6 i αvβ8 [13, 40, 96].

Po 4 godzinach od zakażenia rozpoczyna się ekspresja EBNA-2 (Epstain-Barr Nuclear Antigen-2) i EBNA-LP (Epstain-Barr Nuclear Antigen-Leader Protein), a w następstwie deregulacja cyklu komórkowego i indukcja czynników wzrostu. Po 12 godzinach następuje ekspresja: LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) oraz EBNA-3A, -3B, -3C co powoduje indukcję receptora dla czynników wzrostu, transformację wzrostu komórki, zahamowanie apoptozy i immunomodulację. Po 20 godzinach następuje cyrkularyzacja genomu (tworzenie episomu) EBV i ekspresja EBNA-1 [49].



Rys. 1. A – budowa wirusa Epsteina-Barr, B – schemat budowy genomu EBV



Rys. 2. Schemat wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami EBV, cząstkami regulatorowymi i ekspresją DNA komórkowego i wirusowego

Pomiędzy 24 a 72 godziną od zakażenia komórka gospodarza ulega zmianom morfologicznym: średnica zwiększa się o około 30%, jądro powiększa się i następuje ekspresja HLA-DR [75]. W wyniku działania białek wirusa ekspresji ulega antygen CD23, ligand dla CD21, co pozwala przekazywać sygnał pobudzający komórkę do proliferacji. Po 3–4 dniach następuje wejście w fazę S cyklu komórkowego [87]. Jednocześnie z replikacją DNA komórki następuje replikacja DNA wirusa.

W ponad połowie przypadków pierwotne zakażenie EBV przebiega bezobjawowo lub bardzo łagodnie. W wieku młodzieńczym zakażenie może przybierać postać mononukleozy zakaźnej (IM), samoograniczającej się choroby limfoproliferacyjnej krwi. Wśród występujących dość sporadycznie powikłań wymienia się zespół Guillaina-Barra lub inne objawy ze strony układu nerwowego. Niezwykle rzadko dochodzi do rozwoju przewlekłego zakażenia EBV [16, 19].

5. Molekularne podstawy zakażenia latentnego EBV

Odpowiedź immunologiczna, zarówno humoralna jak i komórkowa nie eliminuje EBV z zakażonego organizmu. Wirus ten wykształcił szereg mechanizmów obronnych pozwalających na utrzymywanie infekcji w komórkach gospodarza. Stan latencji ustala się w limfocytach, materiał genetyczny wirusa przyjmuje formę episomalną, replikuje się i jest przekazywany do komórek potomnych. W odróżnieniu od cyklu litycznego EBV, podczas którego ekspresji ulega ponad 80 antygenów w czasie zakażenia latentnego ma miejsce synteza tylko części białek wirusowych: sześciu antygenów jądrowych (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, LP) , trzech białek membranowych (LMP-1,-2A i -2B) oraz dwóch małych fragmentów RNA (EBERs-1 i -2). Prawdopodobnie ograniczenie ekspresji genów w fazie latencji jest jednym z głównych mechanizmów ucieczki wirusa przed mechanizmami obrony ze strony gospodarza [60].

Na rysunku 2 przedstawiono schemat wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami EBV, cząstkami regulatorowymi i ekspresją DNA komórkowego i wirusowego.

W ustalaniu latencji biorą udział białka: EBNA-1, EBNA-2 i LMP-1, przy czym kluczowe jest EBNA-2, które wraz z EBNA-1 stymuluje promotor LMP-1 [89, 98].

W zależności od ekspresji antygenów wyróżniamy cztery typy latencji. W przypadku latencji typu 0 większość limfocytów spoczynkowych pamięci nie wykazuje ekspresji żadnych antygenów wirusowych, co pozwala im pozostać niewidocznymi dla systemu immunologicznego gospodarza. Typ I latencji związany z ekspresją EBNA-1 i EBERs jest obserwowany w krążących komórkach B podczas ich podziału oraz w chłoniaku Burkitta. W typie II latencji obok EBNA-1 i EBERs ulegają ekspresji także LMP-1 i LMP-2. Ten typ latencji występuje w przypadku raka jamy nosowo-gardłowej,

raka żołądka, choroby Hodgkina i chłoniaka z komórek T. W najbardziej immunogennym typie III latencji dodatkowo wykrywane są białka z rodziny EBNA 3 (-3A, -3B i -3C). Dzieje się tak w przypadku pacjentów poddanych immunosupresji, u których rozwinęła się potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna (PTLD) oraz u chorych na AIDS, u których stwierdzono chłoniaka [30, 37, 98].

6. Białka fazy latentnej

EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Protein-1) to fosfoproteina wiążąca DNA, niezbędna do replikacji i zachowania genomu EBV. Odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu autonomii episomu EBV w fazie latentnej [57]. Dimery EBNA-1 wiążą się do krótkich sekwencji (DS--dyad symmetry) regionu OriP w genomie wirusa, który zawiera dwa odrębne miejsca wiążące EBNA-1, każdy o wielkości 18 pz. Podczas wiązania się EBNA-1 do OriP wirus wykorzystuje enzymy gospodarza do sterowania wszystkimi potrzebnymi etapami replikacji. Miejsce wiązania EBNA-1 ulokowane jest w pozycji +10 i +30 w dół od promotora Qp. Promotor ten działa w odpowiedzi na wiele czynników transkrypcji zabezpieczając i utrzymując odpowiedni poziom EBNA-1 ale jest on regulowany sprzężeniem zwrotnym przez nadmiar EBNA-1. L e e i wsp. wykazali, że EBNA-1 i Ori P regulują replikację wirusa, jednak nie wyjaśniono do końca mechanizmów tego działania. Wiadomo natomiast, że podczas cyklu latentnego replikacja genomu wirusa jest zsynchronizowana z cyklem komórkowym [3, 46, 51].

EBNA-1 kontroluje podział genomu EBV podczas podziału komórki poprzez łączenie z białkiem EBP2 (EBNA-1 binding protein 2) związanego z chromosomem mitotycznym [49].

Poprzez wiązanie do proteazy HAUSP (herpes-virus--associated ubiquitin-specific protease) EBNA-1 jest zaangażowane w regulację p53, czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w szczególności w aktywację mechanizmów naprawy DNA lub indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. [49].

Białko EBNA-1 warunkuje przeżycie zakażonych limfocytów B ponieważ koduje fragmenty tripletów aminokwasów gly-gly-ala, które blokują degradację białka na drodze proteolizy a w konsekwencji prezentację antygenów wirusowych przez układ HLA I limfocytom cytotoksycznym. [61].

EBNA-1 jest obecne we wszystkich typach latencji, a także jako jedyne z białek typu EBNA jest produkowane także w czasie aktywacji do cyklu litycznego [93].

Białko EBNA-2 (Epstein-Barr Nuclear Protein-2) to główny transkrypcyjny czynnik regulujący ekspresję genów wirusowych. Koordynuje pozytywnie ekspresję genów wirusa w latencji typu III. EBNA-2 posiada domenę aktywacji transkrypcji, jednak nie wiąże się bezpośrednio z DNA lecz z białkami, które wiążą się z DNA w regionie promotora. Oddziałuje zarówno z wirusowymi jak i komórkowymi promotorami transkrypcji. EBNA-2 aktywuje między innymi promotor LMP-1 oraz LMP-2 (Latent Membrane Protein-1 i Latent Membrane Protein-2). Transaktywuje także wiele genów komórkowych odgrywających kluczową rolę w unieśmiertelnianiu i proliferacji komórki po zakażeniu [95]. Razem z EBNA-LP (Epstein-Barr Nuclear Antigen- Leader Protein) wzmacnia ekspresję receptorów CD23 (powierzchniowych markerów aktywowanych komórek B), pobudzając w ten sposób inne limfocyty do proliferacji, oraz receptora CD21 (ligandu dla gp350). Reguluje pozytywnie również ekspresję wirusowego promotora EBNA--3C oraz komórkowego protoonkogenu c-myc, przez co wpływa na proliferację limfocytów B [79]. EBNA-2 wiąże się specyficznie z RBP-Jκ (Retinoblastoma Binding Protein), które wiąże się specyficznie z DNA i jest zaangażowane w ścieżce przekazywania sygnałów Notch. Geny *Notch* kodują powierzchniowe receptory komórkowe, które regulują różnicowanie wielu typów komórek [89, 55]. Mutacja loci *Notch* prowadzi do anomalii: od postrzępienia skrzydełek Drosophila melanogaster po rozwój nowotworów w komórkach T u ludzi. EBNA-2 jest też pierwszym białkiem latentnym wykrywanym (razem z EBNA-LP) po zakażeniu EBV [62]. Wyróżniamy dwa typy EBNA-2 różniące się serologicznie, korespondujące z typami EBV-1 i EBV-2 [77].

Po zakażeniu limfocytów B wirusem Epsteina-Barr EBNA-LP, jak wcześniej wspomniano, ulega ekspresji jako jedno z pierwszych białek. Wraz z EBNA-2 uczestniczy w procesie wprowadzania spoczynkowych limfocytów B w fazę G_1 cyklu komórkowego, poprzez wiązanie i inaktywację komórkowego białka p53 i produktu genu supresorowego Rb (retinoblastoma protein) [83]. Wspólnie z EBNA-2 indukuje też promotor LMP-1 w niektórych typach chłoniaka Burkitta oraz ścieżce przekazywania sygnałów Notch. EBNA-LP łącząc się z kompleksem białek komórkowych ISI i X-1 tworzy kompleks HAX-1 (HS-1-associated protein X-1), którego sekwencja aminokwasów wykazuje podobieństwo do komórkowej proteiny Nip3 (nineteen kD interacting protein-3), wchodzącej w interakcję z inhibitorem apoptozy Bcl-2 lub BHRF-1 jego wirusowym homologiem, przez co pełni potencjalnie funkcję regulującą apoptozę zakażonych limfocytów B [56]. EBNA-LP odpowiada także za redystrybucję EBNA-3A w jądrze oraz bierze udział w splicingu RNA (składaniu pre--mRNA) [69].

EBNA-3A, -3B, -3C to białka indukujące proces unieśmiertelniania limfocytów B oraz wywołujące wzmożoną odpowiedź immunologiczną. Białka te kodowane są przez trzy geny sąsiadujące ze sobą w genomie wirusa; sekwencja tych genów jest homologiczna odpo-

wiednio w 84, 80 i 72%. Na podstawie różnic w strukturze EBNA-3A, -3B, -3C wyróżniono dwa typy EBV-1 i EBV-2 [44, 95]. Wszystkie białka z rodziny EBNA-3 oddziałują z czynnikiem RBP-Jκ, a także z czynnikiem wiążącym Cp-1, który wchodzi w skład ścieżki przekazywania sygnałów Notch. Nadekspresję białek biorących udział w ścieżce Notch obserwowano u ludzi w nowotworach z limfocytów T. Jednak sposób w jaki białka EBNA-3 wpływają na czynnik Cp-1 nie jest do końca poznany [49].

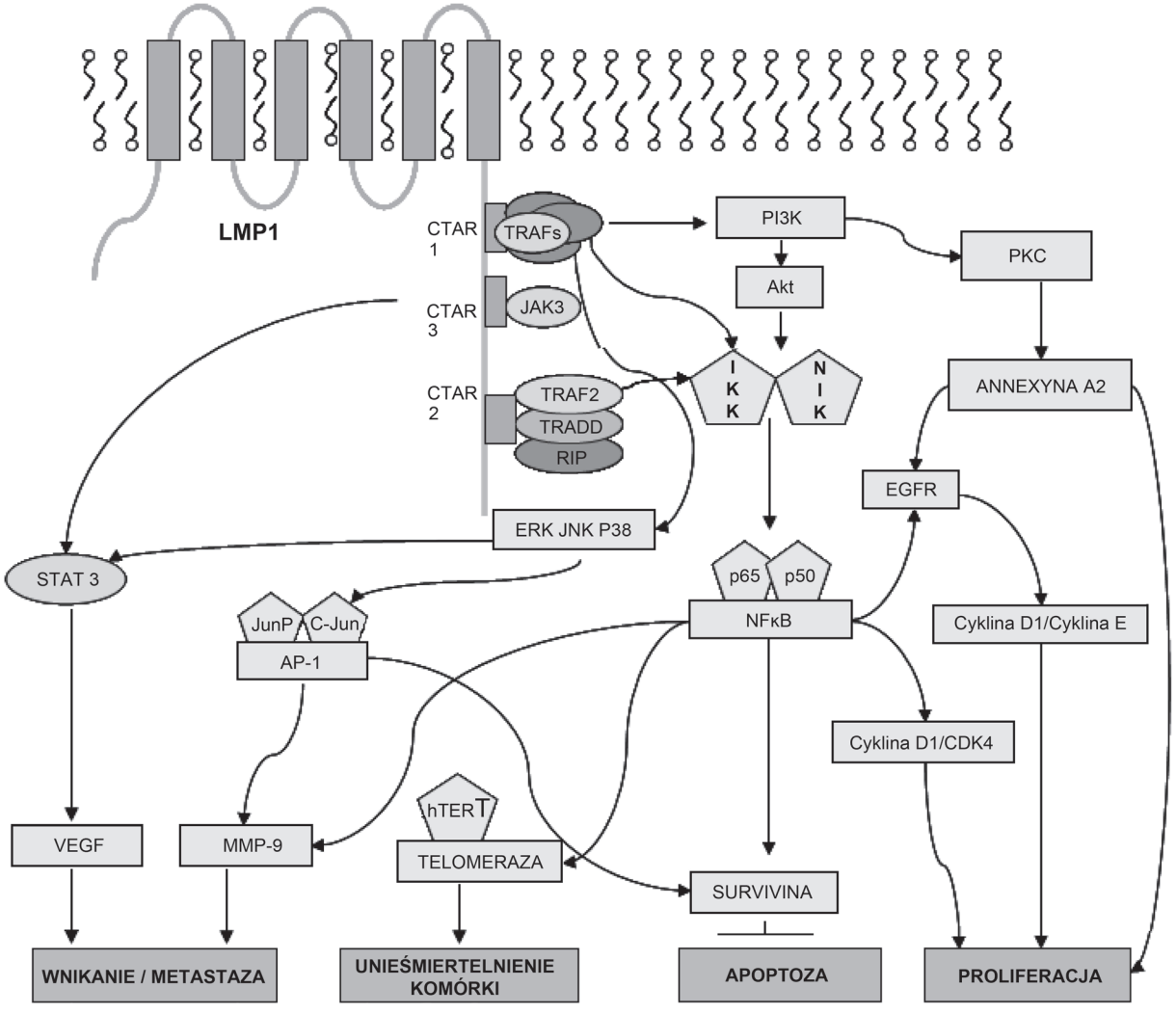
EBNA-3A i EBNA-3C, w przeciwieństwie do EBNA--3B są niezbędne w procesie transformacji i immortalizacji komórek B *in vitro* [62]. EBNA-3C może przełamać punkt kontroli retinoblastomy i znieść supresję genu retinoblastomy w fazie G_1 cyklu komórkowego [84]. Wykazano też, że EBNA-3C zwiększa syntezę LMP-1 w niektórych nowotworach [1, 50]. Wykazano, że EBNA-3A i EBNA-3C tłumią transkrypcję aktywowaną przez RBP-Jκ-EBNA-2 poprzez zahamowanie wiązania RBP-Jκ do DNA. EBNA-3C i prawdopodobnie EBNA-3A mogą wspólnie z EBNA-2 odgrywać rolę jako aktywator genu LMP-1 [53]. Wskazuje to na istnienie sieci wzajemnych powiązań, którą, wpływając na siebie nawzajem, tworzą białka EBNA-3 i wszystkie czynniki transkrypcji EBNA [49].

Białko LMP-1 jest integralnym białkiem błony plazmatycznej, o wielkości 62-kD, zbudowanym z trzech segmentów. W pierwszym segmencie krótki, cytoplazmatyczny N-koniec (24aa) jest odpowiedzialny za zorientowanie białka w błonie komórkowej i przyłączenie ubikwityny. Drugi segment z sześcioma hydrofobowymi domenami (161aa) ma zdolność oligomeryzacji cząsteczki LMP-1 i aktywacji małej GTPazy Cdc42 inicjującej reorganizację cytoszkieletu. Analiza mutacji dowiodła, że koniec -NH_2 i segment transmembranowy białka LMP-1 są odpowiedzialne za agregację błony, a ta agregacja jest kluczowa dla immortalizacji komórki [59]. LMP-1 tworzy w błonie plazmatycznej agregaty takie jak związane z ligandem receptory czynnika wzrostu [14]. W trzecim segmencie długi cytoplazmatyczny C-koniec (~200aa) dzieli się na trzy ważne regiony aktywujące – CTAR (C-terminal activating regions). Regiony te są miejscem przyłączania i aktywacji swoistych białek komórkowych. CTAR1 i CTAR2, nazywane również miejscami transformacji efektora, są niezbędne do transformacji limfocytów B. Końcowa domena -COOH białka LMP-1 wykazuje powinowactwo do TRAF-1 i TRAF-2 (TNF tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 i -2) oraz TRADD (białko wzmacniające z powinowactwem do domeny śmierci receptora TNFα, TNFα-receptor associated death domain) [15, 17]. Miejsce transformacji efektora-1 CTAR1 wiąże TRAF, a miejsce wiązania efektora-2 CTAR2 wiąże TRADD [41, 88]. LMP-1 bierze udział w transformacji komórki przez połączenie z tymi samymi białkami adaptorowymi związanymi z TRAFs, które łączą się z receptorem CD40. Naśladuje w ten sposób sygnały wzrostu komórkowego, które zwykle są wynikiem wiązania ligandu CD40 [26]. Wiązanie białek do LMP-1 indukuje kaskadę sygnałów, które wzmacniają żywotność i wzrost komórki. W chwili obecnej potwierdzona jest aktywacja przez LMP-1 siedmiu ścieżek przekazywania sygnałów. Na N-końcu LMP-1 następuje: ubikwitynizacja, aktywacja Cdc42, natomiast na C-końcu następuje aktywacja: NFκB (nuclear factor kappa B) poprzez kinazę indukującą czynnik NFκB (NIK), czynnika aktywującego transkrypcję-2 (ATF-2) poprzez p38/aktywującą mitogen kinazę białkową (MAPK), czynników transdukcji i transkrypcji (STATs) poprzez kinazę Janusa (JAK) białka aktywatorowego 1 (AP-1) poprzez N-terminalną kinazę (JNK) oraz kinazy Akt poprzez kinazę fosfatydylinozytolu (PI3K) [78, 97]. Schemat działania tych ścieżek pokazano na rysunku 3.

Receptor dla TNF występuje w dwóch odmianach, każda z nich mobilizuje inny rodzaj białek adaptorowych i wywołuje przeciwstawny efekt komórkowy: apoptozę (receptor 55) lub proliferację (receptor 75). Poprzez związanie z białkami TRAF-1 i TRAF-2 połączonymi z fragmentami receptora p75 powoduje wewnątrzkomórkową aktywację antyapoptycznych czynników transkrypcyjnych; NFκB, AP-1 i STAT-1 a w następstwie proliferację zakażonych limfocytów B [64, 78].

Kaskada aktywacji ścieżek przekazywania sygnałów współdziałająca z LMP-1 prowadzi do wzmocnienia ekspresji cząstek adhezyjnych komórek B (LFA-1, CD54, CD58), wzmocnienia ekspresji markerów aktywacji komórek B (CD23, CD39, CD40, CD44 i HLA klasy II) i morfologicznych zmian takich jak aglutynacja (zlepianie komórek) [52]. Interakcje z LMP-1 powodują również nadekspresję białek BCL-2 i A20, które chronią zakażone komórki przed p53-zależną apoptozą [25, 92]. Ponadto uważa się, że LMP-1 jest powiązany z onkogenezą również przez zdolność wbudowywania i rearanżacji genów komórkowych.

LMP-2A i LMP-2B to dwa integralne z błoną komórkową białka hydrofobowe, kodowane przez gen LMP-2. Różnią się między sobą domeną N terminalną, zawierającą motyw aktywujący tyrozynozależny immunnoreceptor. LMP-2A zawiera dodatkową domenę, kodowaną w egzonie 1, podczas gdy w białku LMP-2B egzon 1 jest niekodujący. Wykazano, że w komórkach epitelialnych ekspresja obu białek LMP-2 jest związana ze wzrostem zdolności tych komórek do rozprzestrzeniania się i migracji w matriks międzykomórkowej [2, 71]. LMP-2A nie jest niezbędne w transformacji limfocytów B ale interferuje z ich receptorami sygnałowymi. Zebrane wyniki sugerują udział LMP-2A w utrzymywaniu latencji i modyfikacji rozwoju komórek B [28, 62]. LMP-2A hamuje wewnętrzne wydzielanie interleukiny 6, co skutkuje negatywną regulacją ekspresji



Rys. 3. Schemat budowy LMP-1, wiązania białek i indukcji kaskady sygnałów wzmacniających żywotność i wzrost komórki

NFκB [64]. Stała ekspresja LMP-2A w chorobie Hodgkina i raku nosogardzieli wskazuje na ważną, aczkolwiek jeszcze nieznaną rolę w onkogenezie. Funkcja LMP-2B jest słabo poznana. Obecnie prowadzone badania sugerują, że może modulować aktywność LMP-2A [67].

7. Reaktywacja zakażenia latentnego

Reaktywacja wirusa i wejście w cykl lityczny może być spowodowane różnymi przyczynami, między innymi spadkiem odporności gospodarza. U pacjentów po zabiegu transplantacji leczenie immunosupresyjnie może być przyczyną rozwoju choroby limfoproliferacyjnej (PTLD).

Pierwszym białkiem cyklu litycznego jest białko Z, produkt genu BZLF-1 (nazywane również białkiem Zta lub ZEBRA) oraz białko R produkt genu BRLF-1. Oba białka autostymulują swoją własną ekspresję, wzajemnie się indukując i są niezbędne do wspólnej indukcji pełnego kompletu wczesnych genów wirusa potrzebnych do litycznej replikacji EBV [23, 70, 82] .

Białko Z jest aktywatorem transkrypcji wiążącym się do motywu AP-1-podobnego w promotorach wczesnych genów litycznych i indukującym cykl lityczny w komórkach zakażonych latentnie EBV [22]. S a v a r d i wsp. wykazali, że w pierwotnej infekcji monocytów przez EBV, ekspresję transkryptu BZLF-1 można wykryć w dwie godziny po zakażeniu. Niektórzy autorzy donoszą, że białko Z może indukować ekspresję regulatorów cyklu komórkowego włącznie z p53 i wstrzymać cykl komórkowy [9, 18]. Przypuszczalnie zahamowanie funkcji p53 pozwala przeżyć komórkom podczas wczesnej fazy zakażenia EBV, co ma wpływ na stabilizację latencji. Ponadto stwierdzono, że ekspresja BZLF-1 we wczesnych pasażach limfoblastoidalnych linii komórkowych może prowadzić do tworzenia skupisk nowotworowych i rozpoczęcia ekspresji genów komórkowych [38]. Zatrzymanie cyklu komórkowego jest narzucane przez herpeswirusy podczas wirusowego litycznego cyklu replikacji DNA aby zapobiec konkurencji o wolne nukleotydy występujące w ograniczonej ilości z syntezą DNA komórki gospodarza i aby dostarczyć przestrzeni

nuklearnej dla wirusowego DNA [74]. Z tego punktu widzenia ekspresja BZLF-1 podczas latencji może być pozostałością z cyklu litycznego. W e n i wsp. sugerują, że komórki, w których dochodzi do ekspresji BZLF-1 wchodzą w cykl lityczny i umierają, podczas gdy komórki, w których BZLF-1 nie ulega ekspresji są jedynymi, które przeżyły i ustabilizowały latencję [94].

We wczesnej fazie litycznej syntetyzowane są głównie białka odpowiedzialne za replikację wirusowego DNA. Białka fazy późnej cyklu litycznego modyfikują komórkę gospodarza, uczestniczą w budowie kapsydu i formowaniu nowopowstających wirionów oraz w zakażaniu kolejnych komórek gospodarza.

8. Wirusowe homologi białek komórkowych

Genom EBV koduje kilka ważnych białek będących sekwencyjnymi i funkcjonalnymi homologami różnych białek człowieka.

Białko BCRF-1 wykazuje 80% homologii do ludzkiej interleukiny 10 (IL-10). IL-10 posiada przede wszystkim zdolność do hamowania aktywacji i funkcji efektorowych limfocytów T, monocytów i makrofagów. Jest czynnikiem wzrostu i aktywacji dla limfocytów B. Odgrywa również rolę w ustaleniu latencji poprzez supresję systemu immunologicznego gospodarza [33, 89].

BDLF-2 to białko, które jest homologiem ludzkiej cykliny B1, która poprzez aktywację poszczególnych cyklinozależnych kinaz białkowych reguluje przejście z fazy G_1 w fazę M w cyklu komórkowym. Wciąż jeszcze mało wiadomo na temat proteiny BDLF-2. Jej obecność wykrywana była w przypadkach białaczki włochatokomórkowej, ale nie w innych chorobach charakteryzujących się zakażeniem latentnym. Sugeruje się, że jest to późny gen ulegający ekspresji w cyklu litycznym [31].

BARF-1 (nazywane również p29) jest wczesnym białkiem wykazującym homologię do wewnątrzkomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 jak również do receptora ludzkiego czynnika tworzenia kolonii co skutkuje zahamowaniem aktywności makrofagów [86]. Jest także zdolny do zahamowania wydzielania INF-alfa i immortalizacji pierwotnych komórek epitelialnych [24]. Ekspresję BARF-1 stwierdzono w biopsjach tkanek nowotworowych: z NPC i EBV-zależnych przypadkach raków żołądka, a także w chłoniaku z komórek B spotykanym w Malawi i nosowym chłoniaku z komórek NK/T. Dane te świadczą o udziale BARF-1 w procesach nowotworzenia. Ekspresja BARF-1 w linii komórkowej Louckes indukuje ekspresję protoonkogenu c-myc i B-komórkową aktywację antygenów CD21 i CD23 [65].

BHRF-1 komponent wczesnego antygenu (Early Antigen Complex) to białko wykazujące 25% homologii do ludzkiego onkogenu Bcl-2. Wykazano zdolność Bcl-2 i BHRF-1 do ochrony ludzkich limfocytów B przed apoptozą [34]. Spektroskopowe oznaczenie struktury BHRF-1 wykazało jednak pewne różnice strukturalne sugerujące, że działanie mechanizmu antyapoptycznego jest w tym przypadku inne niż komórkowy mechanizm Bcl-x_L lub Bcl-2 [39]. Uważa się, że BHRF-1 może przedłużać żywotność komórki dopuszczając do nagromadzenia się w niej mutacji onkogennych. Pozwala również na produkcję maksymalnej ilości wirionów podczas zahamowania apoptozy [66].

9. Właściwości onkogenne EBV

Do powstania nowotworu niezbędne są co najmniej dwa czynniki: zaburzenie przekazywania sygnałów i unieśmiertelnienie komórki. Wirusy onkogenne posiadają zdolność unieśmiertelniania komórki zakażonej, powodując jej niekontrolowaną proliferację i transformację nowotworową. Genom EBV koduje szereg białek, wykazujących homologię lub oddziałujących z wieloma cząsteczkami o charakterze antyapoptycznym, cytokinami i transduktorami sygnałów w komórce. Mogą dzięki temu promować zakażenie EBV, immortalizację i transformację zakażonej komórki [8].

Przyjmuje się, że aby wirus uznany został za czynnik etiologiczny nowotworu muszą zostać spełnione pewne warunki: musi istnieć związek epidemiologiczny pomiędzy występowaniem wirusa i nowotworu, musi zostać stwierdzona obecność antygenu lub genomu wirusa w komórkach nowotworu, wirus musi być izolowany z tkanki nowotworowej i być zdolny do transformacji komórek *in vitro*. Wirus Epsteina-Barr spełnia wszystkie wymienione wyżej warunki.

10. Nowotwory powiązane z zakażeniem EBV

Chłoniak Burkitta jest najwcześniej opisanym nowotworem. Jest on powiązany z zakażeniem EBV. Występuje w trzech postaciach – endemicznej, sporadycznej i u osób z HIV. DNA EBV jest wykrywane w ponad 95% przypadków endemicznych BL i 15–30% sporadycznych BL. Wśród osób zakażonych HIV, które rozwinęły BL obecność wirusa stwierdza się u 40–50% chorych [98].

W postaci endemicznej jako kofaktor BL wywołujący supresję limfocytów T wymienia się zakażenie zarodźcem malarii. Ostatnie badania dowodzą, że CIDR1α, białko produkowane przez Plasmodium falciparum może indukować cykl lityczny [12].

Bez względu na miejsce występowania i związek z EBV chłoniak Burkitta jest nieodmiennie związany ze swoistą translokacją chromosomalną długiego ramienia chromosomu 8 niosącego protoonkogen c-myc i jednego z *loci* ciężkiego lub lekkiego łańcucha immunoglobuliny na chromosom 14 (ciężki łańcuch), 2 lub

22 (κ lub λ lekki łańcuch). W konsekwencji powoduje to ciągłą ekspresję białka c-MYC, które stymuluje proces dojrzewania i proliferacji komórek oraz warunkuje przejście z fazy G_1 do S cyklu komórkowego [91]. Translokacja ta powoduje również, że transkrypcji ulega wyłącznie białko EBNA-1, które jest nieimmunogenne dla limfocytów T. Wciąż jednak pozostaje wiele nie rozstrzygniętych kwestii dotyczących zależności występowania geograficznego, kofaktorów i etiologii EBV-negatywnych przypadków chłoniaka Burkitta [6].

Drugim nowotworem powiązanym z EBV jest występujący endemicznie rak jamy nosowo-gardłowej (NPC – nasopharyngeal carcinoma). W 1969 roku do badań NPC zastosowano test immunofluorescencyjny, którym wcześniej wykryto antygeny przeciwko EBV w komórkach chłoniaka Burkitta. Henle potwierdził wysoką reaktywność surowicy otrzymaną od chorego z NPC wobec antygenu przeciwko EBV [35]. Rok później zur Hausen potwierdził metodą hybrydyzacji obecność DNA EBV w komórkach raka jamy nosowo-gardłowej [99]. Obecnie według klasyfikacji WHO wyróżnia się trzy typy NPC: typ I – rak płaskonabłonkowy rogowaciejący (keratinising squamous-cell carcinoma), typ II – rak nierogowaciejący (non-keratinising carcinoma), typ III – rak niezróżnicowany (undifferentiated carcinoma). Z EBV powiązane są głównie typy II i III, natomiast w opublikowanych pracach dotyczących typu I znajdują się zarówno dane potwierdzające jak i nie potwierdzające obecności materiału genetycznego wirusa w komórkach nowotworu [29].

Najwięcej przypadków zachorowań na NPC odnotowuje się w południowo-wschodniej Azji: Chinach, Wietnamie i Filipinach, a także w Tunezji i na Alasce. Pierwotnie zakładano, że zwiększone ryzyko zachorowania na NPC w tym regionie może być związane ze spożywaniem konserwowanej żywności (szczególnie ryb), jednak późniejsze badania nie wykazały jednak wyższego poziomu nitrozoamin i bakterii mutagennych w badanych próbkach żywności. I t o i wsp. stwierdzili, że występujące w oleju tungowym HHPA (Hexahydrophthalic Anhydride) aktywuje cykl lityczny EBV [29]. Stwierdzono także wpływ czynników genetycznych m.in. polimorfizmu genu TLR3 (Toll-like receptor 3) kodującego receptor, który odgrywa istotną rolę w zakażeniu EBV. [32]. Problem diety i wpływu środowiska w etiologii NPC jest cały czas przedmiotem intensywnych badań.

Ziarnica złośliwa (choroba Hodgkina) to grupa limfoidalnych rozrostów nowotworowych, morfologicznie wyróżniająca się występowaniem charakterystycznych olbrzymich komórek, nazywanych komórkami Reed-Stenberga [43]. W obecnej klasyfikacji wyróżnia się pięć postaci: chłoniak guzkowy Hodgkina z przewagą limfocytów (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma) stanowi ok. 5% wszystkich przypadków HD, w komórkach guza nie stwierdza się materiału genetycznego EBV; ziarnica typu NS (nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma) to około 65–75% przypadków HD, czasem stwierdza się wcześniejsze zakażenie EBV; ziarnica typu MC (mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma) to około 20–25% HD w ponad 70% komórek RS wykrywa się genom EBV; ziarnica typu LD (lymphocyte depleted calssical Hodgkin lymphoma) stanowi mniej niż 5% przypadków ziarnicy złośliwej, często wiąże się z zakażeniem EBV; klasyczna ziarnica bogata w limfocyty (lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease) to dość rzadka postać ziarnicy, w około 40% stwierdza się zakażenie EBV [4, 11].

Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna (post-transplant lymphoproliferative disorder – PTLD) to heterogenna grupa chorób charakteryzująca się niekontrolowaną proliferacją z komórek układu chłonnego, najczęściej limfocytów B (90%) rzadziej limfocytów T (9%) lub komórek NK (0,5%). Najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju PTLD jest zakażenie EBV po transplantacji. Wzrasta ono u biorców EBV-seronegatywnych i waha się od 23% do 50%. Natomiast u biorców EBV-seropozytywnych wynosi od 0,7% do 1,9%. Zakażenie EBV może prowadzić do proliferacji komórek układu chłonnego niezależnie od rodzaju zakażenia (pierwotne czy reaktywacja) [45]. Przyczyną jest transformacja blastyczna komórek zakażonych EBV. Ze względu na różnice występujące w przebiegu i w obrazie klinicznym wyróżnia się wczesną i późną PTLD. W ujawniającej się przed upływem roku, wczesnej PTLD, znacznie częściej stwierdza się związek z zakażeniem EBV. Ostatnie badania nie potwierdziły skuteczności leków przeciwwirusowych w leczeniu PTLD. Bardziej celowe wydaje się ich zastosowanie w profilaktyce niż terapii rozpoznanej PTLD [42, 85].

Zakażenie EBV wiązane jest także w mniejszym lub większym stopniu z rozwojem nieziarniczych chłoniaków nosowych z komórek T/NK w 90% przypadków i angioimmunoblastycznych 0–51% przypadków, raka żołądka lymphoepithelioma-like w około 90% i adenocarcionoma 5 do 25% przypadków [5]

W chorobie Duncana (zespół limfoproliferatywny uwarunkowany w chromosomie X) zakażenie EBV prowadzi do niekontrolowanego wzrostu populacji limfocytów T i komórek NK których aktywność skierowana jest przeciw nie zakażonym komórkom [72].

Zakażenie EBV jest czynnikiem etiologicznym różnych chłoniaków u osób z HIV/AIDS, zarówno układu limfoproliferacyjnego jak i centralnego układu nerwowego (30–90%) [10].

11. Podsumowanie

EBV jako przedstawiciel *Gammaherpesvirinae* posiada zdolność ustalania latencji w limfocytach B, wykorzystując receptor CD21. Podczas cyklu litycz-

nego, aktywowanego przez białko Z ekspresji ulegają geny odpowiadające za replikację wirusowego DNA, białka strukturalne kapsydu, tegumentu i umożliwiające fuzję z komórkami gospodarza. Genom wirusa koduje też białka będące strukturalnymi bądź funkcyjnymi homologami białek ludzkich. W wyniku ekspresji niektórych genów EBV w czasie cyklu latentnego syntetyzowanych jest sześć białek jądrowych (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C i -LP); trzy białka membranowe (LMP-1, -2A, -2B) oraz 2 małe fragmenty RNA (EBER-1 i -2). Białka te odpowiadają za otrzymywanie latencji, episomu, immortalizację komórek gospodarza i ich transformację blastyczną. W zależności od ekspresji tych genów wyróżniamy cztery typy latencji.

Zakażenie EBV szerzy się głównie drogą kropelkową. W większości przypadków zakażenie pierwotne ma miejsce w dzieciństwie i przebiega bezobjawowo, w okresie młodzieńczym może przyjmować postać mononukleozy. Obecność przeciwciał świadczy, że ponad 90% populacji osób dorosłych przebyło zakażenie EBV.

Choć udział EBV w etiologii endemicznej postaci chłoniaka Burkitta i raka jamy nosowo-gardłowej potwierdzono już ponad 40 lat temu, obecnie wciąż prowadzi się badania nad wpływem tego wirusa na rozwój innych nowotworów. Wyniki nie są jednoznaczne i ciągle pojawiają się kolejne doniesienia potwierdzające lub wykluczające udział EBV w etiologii określonych chorób. Przedmiotem intensywnych badań jest również określenie udziału białek, zarówno latentnych jak i homologów białek ludzkich, w procesach transformacji nowotworowej: ścieżkach przekazywania sygnałów, w inicjowaniu i pobudzaniu podziału komórkowego (kontroli procesów wzrostu i różnicowania), regulacji cyklu komórkowego, ekspresji nowych receptorów powierzchniowych i zmianie budowy cząsteczek adhezyjnych. Badania nad ekspresją białek pozwolą określić które ścieżki przekazywania sygnałów w komórce gospodarza mogą ulec zaburzeniom. Określenie etapu na którym następują zaburzenia powodujące unieśmiertelnienie lub proliferację komórki jest niezwykle istotne w przypadku poszukiwania skutecznych terapii przeciwnowotworowych.

Piśmiennictwo

1. Allday M.J., Farrell P.J.: Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G_1-arrested cells. *J. Virol.* **68**, 3491–3498 (1994)
2. Allen M.D., Young L.S., Dawson C.W.: The Epstein-Barr virus--encoded LMP2A and LMP2B proteins promote epithelial cell spreading and motility. *J. Virol.* **79**, 1789–1802 (2005). Erratum in: *J. Virol.* **79**, 3889 (2005)
3. Altmann M., Pich D., Ruiss R., Wang J., Sugden B., Hammerschmidt W.: Transcritpional activaton by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14188–14193 (2006)
4. Andersson J.: Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. *Herpes.* **13**, 12–16 (2006)
5. Aozasa K., Zaki M.A.: Epidemiology and pathogenesis of nasal NK/T-cell lymphoma: a mini-review. *Scientific World Journal.* **11**, 422–428 (2011)
6. Bornkamm G.W.: Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int. J. Cancer*, **124**, 1745–1755 (2009)
7. Burkitt D., Wright D.H.: A Lymphoma syndrome in tropical Africa with a note on histology, cytology and histochemistry. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **2**, 67–138 (1963)
8. Carbone A., Gloghini A., Dotti P.: EBV-associated lymphoproliferative disorders classification and treatment. *Oncologist*, **13**, 577–585 (2008)
9. Cayrol Y.N., Flemongton E.K.: The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J.* **15**, 2748–2759 (1996)
10. Cesarman E.: Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett.* **305**, 163–174 (2011)
11. Chen M.R.: Epstein-Barr virus, the immune system, and associated diseases. *Front Microbiol.* **2**, 1–5 (2011)
12. Chene A., Donati D., Guerreiro-Cacais A.O., Levitsky V., Chen Q., Falk K.I., Orem J., Kironde F., Wahigren M., Bejarano M.T.: A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PloS Pathog.* **3**, 826–834 (2007)
13. Chesnokova L.S., Nishimura S.L. Hutt-Fletcher L.M.: Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20464–20469 (2009)
14. Clausse B., Fizazi K., Walczak V., Tetaud C., Wiels J., Tursz T. i wsp.: High concentration of the EBV latent membrane protein 1 in glycosphingolipid-rich complexes from both epithelial and lymphoid cells. *Virology*, **228**, 285–293 (1997)
15. Coffin W.F. 3rd, Erickson K.D., Hoedt-Miller M., Martin J.M.: The cytoplasmic amino-terminus of the latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxyterminus and transmembrane domain. *Oncogene,* **20**, 5313–5330 (2001)
16. Collier L., Oxford J.: Wirus Epsteina-Barr. w: Wirusologia Lekarska. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001, s. 245–253.
17. Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K., Kaye K.M., Kleijnen M.F., Kieff E. i wsp.: Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-κB activation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7098–7108 (1996)
18. Dreyfus D.H., Nagasawa M., Kelleher C.A., Gelfand E.W.: Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1 encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphomablastoid cells. *Blood*, **96**, 625–634 (2000)
19. Ebell M.H.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am. Fam. Physician.* **70**, 1279–1287 (2004)
20. Epstein M.A., Achong B., Barr Y.M.: Virus particles in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, **1**, 702–703 (1964)
21. Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y. M.: Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**, 761–770 (1965)
22. Farrell P.J., Rowe D.T., Rooney C.M., Kouzarides T.: Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and related to c-fos. *EMBO J.* **8**, 127–132 (1989)
23. Feederle R., Kost M., Baumann M., Janz A., Drouet E., Hammerschmidt W., Delecluse H.J.: The Epstein-Barr virus lytic

program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J.* **19**, 3080–3089 (2000)
24. Fiorini S., Ooka T.: Secretion of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 oncoprotein from latently infected B cells. *Virol. J.* **5**, 70–74 (2008)
25. Fries K., Miller W., Raab-Traub N.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-madiated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J. Virol.* **70**, 8653–8659 (1996)
26. Gires O., Zimber-Strobl W., Pich D., Ueffing M., Marschall G., Ziedler R. i wsp. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics costitutively active receptor molecule. *EMBO J.* **16**, 6131–6140 (1997)
27. Gorzer I., Niesters H.G., Cornelissen J.J., Puchhammer--Stockl E.: Characterization of Epstein-Barr virus Type 1 variants based on linked polymorphism among EBNA-3A, -3B, and -3C genes. *Virus Res.* **118**, 105–114 (2006)
28. Gradoville L., Kwa D., El-Guindy A., Miller G.: Protein kinase c-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J. Virol.* **76**, 5612–5626 (2002)
29. Gullo C., Low W.K., Teoh G.: Association of Epstein-Barr virus with nasopharyngeal carcinoma and current status of development of cancer-derived cell lines. *Ann. Acad. Med. Singapore.* **37**, 769–77 (2008)
30. Hardie D.R.: Human γ-herpesviruses: A rewiev of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus. Apher. Sci.* **42**, 177–183 (2010)
31. Hayes D.P., Brink A.A.T.P., Vervoot M.B.H.J., Middeldorp J.M., Meijer C.J., van der Brule A.J.: Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcript encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Mol. Pathol.* **52**, 97–103 (1999)
32. He J.F., Jia W.H., Fan Q., Zhou X.X., Qin H.D., Shugart Y.Y., Zeng Y.X.: Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population. *BMC Cancer.* **7**, 194–201 (2007)
33. Helminem M., Lahdenpohja N., Hurme M.: Polymorphism of the IL-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* **180**, 496–499 (1999)
34. Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., ickinson A.: Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8479–8483 (1993)
35. Henle G., Henle W.: Seroepidemiology of the virus. w: M.A. Epstein B.G. Achong (eds). The Epstein-Barr virus. 297–320. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
36. Henle G., Henle W., Diehl V.: Relation of Burkitt's tumor associated herpes type virus to infection mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 94–101 (1968)
37. Heslop E.H.: How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood.* **114**, 4002–4008 (2009)
38. Hong G.K., Kumar P., Wang L., Damania B., Gulley L., Delecluse H.J., Polverini P.J., Kenney S.C.: Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factory vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* **79**, 13984–13992 (2005)
39. Huang Q., Petros A., Wirgin H., Fesik S., Olejniczak W.: Solution structure of the BHRF-1 protein from Epstein-BArr virus, a homolog of human Bcl-2. *J. Mol. Biol.* **332**, 1123–1130 (2003)
40. Hutt-Fletcher L.M.: Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* **81**, 7825–7832 (2007)
41. Izumi K., Kieff E.: The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and NF-κB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12592–12597 (1997)
42. Kalinova L., Indrakova J., Bachleda P.: Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **153**, 251–257 (2009)
43. Kapatai G., Murray P.: Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1342–1349 (2007)
44. Karlin S., Blaisdell B., Schachtel G.: Contrast in codon usage of latent versus productive genes of Epstein-Barr virus: data and hypotheses. *J. Virol.* **64**, 4264–4273 (1990)
45. Karst J., Konopka L.: Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna. *Onkol. Pol.* **8**, 209–216 (2005)
46. Kennedy G., Sugden B.: EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6901–6908 (2003)
47. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields B.N., Knipe P.M., Howley et al. (eds.) Fields Virology, Ed. 4, vol. 2, Lippincott-Raven Publ. Philadelphia, 2007.
48. Kirschner A., Omerovic J., Popov B., Longnecker R., Jardetzky T.: Soluble Epstein-Barr virus glycoproteins gH, gL and gp2 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not epithelial cell fusion. *J. Virol.* **80**, 9444–9454 (2006)
49. Klein G., Klein E., Kashuba E.: Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 67–73 (2010)
50. Knight J.S., Lan K., Subramanian C., Robertson E.S.: Epstein--Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J. Virol.* **77**, 4261–4272 (2003)
51. Lee M., Diamond M., Yates J.: Genetic evidence that EBNA-1 is needed to efficient stable infection by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **73**, 2974–2982 (1999)
52. Li H.P., Chang Y.S.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J. Biomed. Sci.* **10**, 490–504 (2003)
53. Lin J., Johannsen E., Robertson E., Kieff E.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J. Virol.* **76**, 2332–2342 (2002)
54. Ling P.D., Tan J. Peng R.S.: Nuclear-cytoplasmic shuttling is not required for the Epstein-Barr Virus EBNA-LP transcriptional coactivation function. *J. Virol.* 2009) **85**(14), 7109–7116.
55. Lucchesi W., Brady G., Dittrich-Breiholz, Kracht M., Russ R., Farrel P.J.: Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type2 EBNA2. *J. Virol.* **82**, 7456–7466 (2008)
56. Matsuda G., Nakajima K., Kawaguchi Y., Yamanashi Y., Hirai K.: Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through HS1-associated protein X-1. *Microbiol. Immunol.* **4**, 91–99 (2003)
57. Middleton T., Sugden B.: Retention of plasmid DNA in mammalian cells enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA-1. *J. Virol.* **68**, 4067–4071 (1994)
58. Miller G.: Book Review, Epstein-Barr Virus. *New Engl. J. Medicine*, **355**, 2708–2709 (2006)
59. Moorthy R., Thorley-Lawson D.: Biochemical, genetic and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein--Barr virus encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J. Virol.* **67**, 2637–2645 (1993)
60. Münz C., Moormann A.: Immune escape by Epstein-Barr virus associated malignancies. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 381–387 (2008)
61. Münz C.: Epstein-barr virus nuclear antigen 1: from immunologically invisible to a promising T cell target. *J. Exp. Med.* **199**, 1301–1304 (2004)
62. Murray P.G., Young L.S.: The role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Front. Biosci.* **7**, 519–540 (2002)

63. Nonoyama M., Kawai Y., Pagano J.S.: Detection of Epstein-Barr virus DNA in human tumors. *Bibl. Haematol.* **40**, 577–583 (1975)
64. Oliveira D.E., Ballon G., Cesarman E.: NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol.* **18**, 248–257 (2010)
65. Ooka T.: BARF1 gene as an EBV encoded oncogene. *EBV Rep.* **8**, 177–182 (2001)
66. Oudejans J.J., van de Brule A.J.C., Jiwa N.M. Bruin P.: BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the bcl-2 (proto-) oncogene, is transcribed in EBV associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes. *Blood*, **86**, 1893–1902 (1995)
67. Pang M.F., Lin K.W., Peh S.C.: The signaling pathways of Epstein--Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **14**, 222–247 (2009)
68. Pope J.I.I., Horne M.K., Scott W.: Transformation of fetal human leukocytes *in vitro* by filtrates of human leukemic cell line containing herpes like virus. *Int. J. Cancer.* **3**, 857–866 (1968)
69. Radkov S.A., Bain M., Farrell P.J., West M., Rowe M., Allday M.J.: Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J. Virol.* **71**, 8552–8562 (1997)
70. Ragoczy T., Miller G.: Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes. *J. Virol.* **73**, 9858–9866 (1999)
71. Rechsteiner M.P., Bernasconi M., Berger C., Nadal D.: Role of latent membrane protein 2 isoforms in Epstein-Barr virus latency. *Trends Microbiol.* **16**, 520–527 (2008)
72. Rezaei N., Mahmoudi E., Aghamohammadi A., Das R., Nichols K.E.: X-linked lymphoproliferative syndrome: a genetic condition typified by the triad of infection, immunodeficiency and lymphoma. *Br. J. Haematol.* **152**, 13–30 (2011)
73. Rickinson A.B., Kieff E.: Epstein-Barr Virus. w: Fields B.N., Knipe P.M., Howley et al. (eds.) Fields Virology, ed. 4, vol. 2, Lippincott-Raven Publ. Philadelphia, 2007.
74. Roizman B., Knipe D.M.: Herpes simplex viruses and their replication. In: M. Knipe, P.M. Howley (eds), Fields virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
75. Rooney C., Howe J.G., Speck S.H., Miller G.: Influences of Burkitt's lymphoma and primary b-cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **63**, 1531 (1989)
76. Rowe D.: Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front. Biosci.* **4**, 346–371 (1999)
77. Rowe D., Clarke J.: The type-specific epitopes of the Epstein--Barr virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein. *J. Gen. Virol.* **70**, 1217–1229 (1989)
78. Shair K.H.Y., Bendt K.M., Edwards R.H., Bedford E.C., Nielsen J.N. Raab-Traub N.: EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFκB, and Stat3 in B cell Lymphomas. *PLoS. Pathog.* **3**, 1669–1683 (2007)
79. Sherif A., Rezk M.D., Lawrence M., Weiss M.D.: Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* **38**, 1293–1304 (2007)
80. Shope T., Decchiano D., Miller G.: Malignant lymphoma in cottontop marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2487–2491 (1973)
81. Rickinson A.B., Kieff E.: Epstein-Barr virus. In: Fields B.N., Knipe P.M., Howley et al. (eds.) Fields Virology, Ed. 4, vol. 2, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2007.
82. Sinclair A.J., Brimmell M., Shanahan F., Farrell P.J.: Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J. Virol.* **65**, 2237–2244 (1991)
83. Sinclair A., Palermo I., Peters G., Farrell P.: EBNA-2 and EBNA--LP cooperate to cause G_0-G_1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **13**, 3321–3328 (1994)
84. Snopok B., Yurchenko M., Szekely L., Klein G., Kashuba E.: SPR--based immunocapture approach to creating an interfacial sensing architecture: Mapping of the MRS18–2 binding site on retinoblastoma protein. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 2063–2073 (2006)
85. Stojanova J., Caillard S., Rousseau A., Marquet P.: Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): Pharmacological, virological and other determinants. *Pharmacol. Res.* **63**, 1–7 (2011)
86. Strockbine L.D., Cohen J.I., Farrah T., Lyman S.D., Wagener F., DuBose R.F. i wsp. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulatingfactor-1 receptor. *J. Virol.* **72**, 4014–4021 (1998)
87. Sugden B.: Latent infection of B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Sem. Virol.* **5**, 197–205 (1994)
88. Thompson M.P., Aggarwal B.B., Shishoda S., Estrov Z. Kurzrock R.: Autocrine lymphotoxin production in Epstein-Barr virus (EBV)-immortalized B-cells: induction via NF-κB activation mediated by EBV-derived latent membrane protein 1. *Leukemia* (*Baltimore*), **17**, 2196–2201 ((2003)
89. Thompson M.P., Kurzrock R.: Epstein-Barr Virus and cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 803–821 (2004)
90. Tiwawech D., Srivatanakul P., Karalak A., Ishida T.: Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais. *J. Clin. Virol.* **42**, 1–6 (2008)
91. Vereide D., Sugden B.: Proof for EBV's sustaining role in Burkitt's lymphomas. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 389–393 (2009)
92. Wang S., Rowe M., Lundgren E.: Expression of the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res.* **56**, 4610–4613 (1996)
93. Weigel R. Fischer D.K., Heston L., Miller G. Constitutive expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs and nuclear antigen during latency and after induction of Epstein-Barr replication. J. Virol. 1985) **53**, 254–259.
94. Wen W., Iwakiri D., Yamamoto K., Maruo S., Kanda T., Takada K.: Epstein-Barr virus BZLF-1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J. Virol.* **81**, 1037–1042 (2007)
95. Wensing B., Farrell P.J.: Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* **2**, 77–84 (2000).
96. Wu H.C,. Lu T.Y., Lee J.J., Hwang J.K., Lin Y.J., Wang C.K., Lin CT.: MDM2 expression in EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Lab. Invest.* **84**, 1547–1556 (2004)
97. Zheng H., Li L., Hu D., Deng X., Cao Y.: Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell. Mol. Immunol.* **4**, 185–196 (2007)
98. Zur Hausen H.: The early days of Epstein-Barr Virus research: the Henle years. In: Robertson, Earl S.. Epstein-Barr Virus. Trowbridge: Cromwell Press. s. 15–22. 2006
99. Zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G., Henle W., Henle G., Clifford P., Santesson L.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, **228**, 1056–1058 (1970)

XXVII ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

DROBNOUSTROJE BEZ GRANIC

LUBLIN, 5–8 WRZEŚNIA 2012

Organizatorzy:

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 1
20-093 Lublin
Tel.: 81 742 37 85
Fax: 81 742 37 81
E-mail: mikrobiologia.lublin@wp.pl
info@xxviizjazdptm.pl

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
Zarząd Główny
00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34

PUBLIKOWANE MATERIAŁY ZJAZDOWE ZOSTAŁY OCENIONE I ZAAKCEPTOWANE
PRZEZ KOMITET ORGANIZACYJNY XXVII ZJAZDU PTM

PROF. MARIA KOZIOŁ-MONTEWKA

KOMITET NAUKOWY

Przewodnicząca:

Prof. dr hab. Waleria Hryniewicz

Członkowie:

Prof. dr hab. Marian Binek
Prof. dr hab. Małgorzata Bulanda
Prof. dr hab. Tamara Daniluk
Prof. dr hab. Włodzimierz Doroszkiewicz
Prof. dr hab. Danuta Dierżanowska
Prof. dr hab. Jan Fiedurek
Prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba
Prof. dr hab. Eugenia Gospodarek
Prof. dr hab. Piotr Heczko
Prof. dr hab. Jerzy Hrebenda
Prof. dr hab. Marek Jagielski
Prof. dr hab. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka
Prof. dr hab. Wiesław Kaca
Prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń
Dr Andrzej Kasprowicz
Prof. dr hab. Adam Kazanowski
Prof. dr hab. Maria Kozioł-Montewka
Prof. dr hab. Józef Kur
Prof. dr hab. Łucja Łaniewska-Trokenheim
Prof. dr hab. Anna Macura
Prof. dr hab. Anna Malm
Prof. dr hab. Wanda Małek
Prof. dr hab. Gayane Martirosian
Prof. dr hab. Stefan Martyniuk
Dr hab. Jacek Międzobrocki, Prof. UJ
Dr n. med. Agnieszka Mikucka
Płk dr Zbigniew Mizak
Prof. dr hab. Anna Przodo-Mordarska
Prof. dr hab. Joanna Radziejewska-Lebrecht
Prof. dr hab. Antoni Różalski
Prof. dr hab. Beata Sadowska
Prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz
Prof. dr hab. Anna Skorupska
Dr Elżbieta Stefaniuk
Prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz
Prof. dr hab. Stanisława Tylewska-Wierzbanowska
Prof. dr hab. Stefan Tyski
Prof. dr hab. Zofia Zwolska

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 205–211
http://www.pm.microbiology.pl

JAK ZDOBYĆ I WYKORZYSTAĆ WIEDZĘ O WIELOGATUNKOWYCH BIOFILMACH?

Tekst wykładu przedstawionego na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie w dniach 5–8 września 2012 r.

Elżbieta Anna Trafny*

Zakład Mikrobiologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Metody badań wielogatunkowych biofilmów. 3. Wielogatunkowy biofilm płytki nazębnej. 4. Wielogatunkowe biofilmy w wodzie. 5. Wielogatunkowe biofilmy w środowisku przemysłowym. 6. Wielogatunkowe biofilmy a rozwój zakażeń

How to gain and use knowledge about multi-species biofilms?

Abstract: Multi-species biofilms form in many natural settings: water, soil or even on dust particles in the air. These biofilms can be also found in the industrial water distribution systems, on surfaces of the metalworking fluids tanks, in food production plants, etc. Many chronic infections involve multi-species biofilms; moreover, commensal vaginal flora or dental plaque bacteria may create such complex microbial consortia. In order to study the composition of microbial community several molecular methods have to be employed; among them metagenomics and proteomics are the most promising. Confocal microscopy in conjunction with fluorescence in situ hybridization as well as the atomic force microscopy are both very useful techniques to study the three-dimensional structure of the mixed-species biofilms. However, many technical obstacles may occur with these consortia during experimentation, e.g., how to grow multi-species biofilms with high reproducibility regarding the quantitative composition of these communities, and whether it is possible to quantitative by assess the metabolic activity and virulence of particular species when grown together in multi-species biofilm. The knowledge of specific traits of multi-species biofilms may contribute to better understanding of the etiology of infectious diseases, increase the efficiency of energy production in microbial fuel cells and lower the cost of biofouling prevention.

1. Introduction. 2. Research methods in the multi-species biofilm studies. 3. Dental plaque multi-species biofilm. 4. Multi-species biofilms in water. 5. Multi-species biofilms in industrial environment. 6. Multi-species biofilms and the development of infections

Słowa kluczowe: wielogatunkowy biofilm, identyfikacja gatunków drobnoustrojów, metody molekularne
Key words: multi-species biofilm, microbial species identification, molecular methods

1. Wprowadzenie

Szeroko zakrojone badania biofilmów bakteryjnych i grzybiczych trwają już ponad 30 lat. Inicjatorem tych badań był profesor William C o s t e r t o n, który wraz ze swoim zespołem wykazał istotną rolę biofilmów bakteryjnych w zakażeniach człowieka i w środowisku [8]. Badania osiadłych populacji bakterii stosunkowo szybko zostały podjęte przez innych uczonych, zwłaszcza w mikrobiologii środowiska, a następnie w mikrobiologii klinicznej. W ich wyniku poznano trójwymiarową strukturę, mechanizmy powstawania, sposoby wzajemnej komunikacji drobnoustrojów, a także szczególne cechy fenotypowe biofilmów, takie jak ich zwiększona tolerancja na środki przeciwdrobnoustrojowe i wytwarzanie pozakomórkowej macierzy – EPS (extracellular polymeric substances). Badania biofilmów prowadzono na wielu modelach doświadczalnych, zarówno w warunkach laboratoryjnych *in vitro*, jak i z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych [33]. W przeważającej liczbie dotyczyły one biofilmów jednogatunkowych. Przegląd piśmiennictwa dokonany w maju 2012 r. w elektronicznej bazie ISI Web of Knowledge, (https://apps.webofknowledge.com) pokazał, że na ogólną liczbę 13 718 publikacji poświęconych badaniu własności biofilmów (w których tytule występuje słowo biofilm), jedynie 192, tj. 1,4% stanowią doniesienia na temat biofilmów wielogatunkowych. Natomiast to właśnie te wielogatunkowe konsorcja stanowią najczęściej występującą w środowisku naturalnym i w organizmach wyższych postać biofilmów [19]. Stąd w obecnie prowadzonych pracach doświadczalnych coraz częściej obiektem badań są biofilmy, w skład których wchodzi więcej niż jeden gatunek drobnoustrojów. Przykładami takich biofilmów są konsorcja drobnoustrojów występujące w zbiornikach wodnych, w glebie, na liściach roślin, w instalacjach przemysłowych, a także w organizmie człowieka w postaci mikroflory pochwy, jelita grubego lub płytki nazębnej. Wykorzystanie dostępnych narzędzi biologii molekularnej, w tym zwłaszcza metagenomiki, pozwala już na poznanie przybliżonego składu gatunkowego tych biofilmów. Szacunkowe wyliczenia wskazują, że jedynie 0,1–1% tych drobnoustrojów jest zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych na rutynowo stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej podłożach hodowlanych.

2. Metody badań wielogatunkowych biofilmów

Metody badania struktur biofilmów jedno- i wielogatunkowych nie różnią się istotnie pomiędzy sobą. Zarówno techniki mikroskopowe, takie jak skaningowa

* Autor korespondencyjny: e-mail: e.trafny@wihe.waw.pl

mikroskopia elektronowa, mikroskopia konfokalna i mikroskopia sił atomowych oraz techniki fizyczne, jak przykładowo mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera będą równie przydatne dla oceny wielkości mikrokolonii i stopnia adhezji drobnoustrojów do powierzchni w obu typach biofilmów [6]. Natomiast bardzo popularne i wykorzystywane na znaczną skalę metody badania biofilmów w formacie mikropłytki z użyciem fioletu krystalicznego lub barwników fluorescencyjnych nie znajdą zastosowania w badaniach wielogatunkowych biofilmów ze względu na brak swoistości znaczników do poszczególnych gatunków drobnoustrojów. Wówczas jednym z rozwiązań może być mikroskopia konfokalna wykorzystana do obserwacji wielogatunkowych konglomeratów z wykorzystaniem techniki FISH (fluorescent in situ hybridization), w której oligonukleotydowe sondy znakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi hybrydyzują z wybranymi fragmentami rybosomalnego RNA drobnoustrojów w sposób specyficzny. Techniki te umożliwiają analizę przestrzennych interakcji różnogatunkowych komórek bakterii lub grzybów [2, 15, 25].

Do analizy wielogatunkowych konsorcjów zaproponowano ostatnio modyfikację techniki FISH poprzez wprowadzenie sond PNA (peptide nucleic acid probes). Sondy PNA są to syntetyczne analogi DNA, które wiążą się z wybranymi sekwencjami RNA/DNA z wyższym powinowactwem, ponieważ ich wypadkowy ładunek elektryczny jest obojętny. Technika ta została z powodzeniem wykorzystana do obserwacji procesu tworzenia wielogatunkowego biofilmu przez *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*, w którym po 48 godzinach wzrostu komórki *E. coli* liczbowo dominowały ($2{,}1\times10^8$ komórek/cm^2) nad *L. monocytogenes* ($6{,}8\times10^7$ komórek/cm^2) i *S. enterica* ($1{,}4\times10^6$ komórek/cm^2). Obserwacje prowadzone za pomocą PNA FISH i mikroskopii konfokalnej wykazały przestrzenne zróżnicowanie umiejscowienia bakterii z poszczególnych gatunków w obrębie biofilmu: pałeczki *E. coli* w postaci jednogatunkowej warstwy rosły w górnych warstwach biofilmu, natomiast biomasę przylegająca do substratu adhezji stanowił mieszany biofilm dwóch gatunków: *L. monocytogenes* i *S. enterica* [1].

W badaniach wielogatunkowych biofilmów odtwarzanie wzajemnych relacji ilościowych pomiędzy poszczególnymi gatunkami drobnoustrojów podczas niezależnych powtórzeń eksperymentów może być związane z pewnymi metodycznymi trudnościami, zwłaszcza w warunkach *in vivo*. Badania wielogatunkowych biofilmów na mysim modelu zakażonej rany wykazały ostatnio, że w prosta inokulacja rany za pomocą zawiesiny bakterii czterech gatunków, takich jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Finegoldia magna* nie prowadziła do zrównoważonego wzrostu tych gatunków w obrębie biofilmu. Pałeczki *P. aeruginosa* całkowicie dominowały liczbowo (100% populacji) w biofilmie hodowanym w ciągu dwóch dni, nawet wówczas gdy w wyjściowym inokulum komórki tego gatunku stanowiły jedynie 1% liczby bakterii w zawiesinie. Obserwacje te wskazały na konieczność przeszczepu biofilmu czterech gatunków bakterii, który hodowano w probówkach laboratoryjnych na fragmentach polipropylenu na powierzchnię rany. Dopiero w takich warunkach możliwe było uzyskanie zrównoważonego rozwoju populacji czterech gatunków bakterii w ranie, chociaż wzajemne proporcje liczbowe komórek tych bakterii ulegały zmianom, a liczebność *E. faecalis* zmniejszyła się wyraźnie (z 23,4 do 6,0%) po 12 dniach wzrostu biofilmu w zakażonej ranie [10].

Utrzymanie stałych proporcji gęstości komórek drobnoustrojów określonego gatunku w obrębie konsorcjum w zadanych warunkach przez dłuższy okres czasu może być też utrudnione ze względu na brak wiedzy na temat wzajemnych relacji pomiędzy gatunkami drobnoustrojów. Dotychczas nie wykonano badań mających na celu charakterystykę wielogatunkowych biofilmów, w skład których wchodziłyby drobnoustroje o zdefiniowanych typach wzajemnych oddziaływań, takich jak np. konkurencja lub komensalizm. Inną trudnością w hodowli wielogatunkowych biofilmów może być sposób pozyskiwania izolatów z próbek środowiskowych lub klinicznych. Już w trakcie izolacji bakterii z hodowli płynnych w namnażających pożywkach dokonywana jest wstępna selekcja klonów bakterii danego gatunku, prowadząc do wystąpienia zjawiska dryftu genetycznego. Namnażane są głównie te klony, które w probówce laboratoryjnej występują w postaci planktonowej, faworyzowana jest ponadto ekspresja genów kodujących produkty podstawowego metabolizmu bakterii przy jednoczesnej eliminacji klonów zjadliwych oraz tych, które przejawiają cechy pożądane dla tworzenia wielogatunkowych biofilmów [9]. Stąd trudnym zadaniem może być pozyskanie powtarzalnych hodowli wielogatunkowych biofilmów z wykorzystaniem laboratoryjnych wzorcowych szczepów bakterii.

Hodowla wielogatunkowych biofilmów, w których bakterie różnych gatunków przylegały do siebie nawzajem powiodła się ostatnio w eksperymentach, w których zasiedlano siatkę polipropylenową, stosowaną w leczeniu przepuklin, za pomocą trzech gatunków bakterii: *S. aureus*, *E. faecalis* i *Enterobacter cloaceae*. Szczepy te pozyskano bezpośrednio z fragmentów siatki polipropylenowej usuniętej pacjentowi z powodu ropnia. Po siedmiu dniach hodowli biofilmu na siatce *in vitro* stwierdzono, że *S. aureus* był dominującym liczbowo gatunkiem w biofilmach. Trójwymiarowa struktura biofilmu przypominała strukturę charakterystyczną dla jednogatunkowych biofilmów, z kanałami wodnymi łączącymi mikrokolonie. Mikrokolonie w obrębie badanego biofilmu utworzone były przez przylegające

do siebie gronkowce, enterokoki i komórki *Enterobacter*, co potwierdzono stosując technikę FISH i mikroskopię konfokalną. Natomiast wzajemne liczbowe proporcje komórek poszczególnych gatunków zmieniały się w czasie, pomimo, że polipropylenowa siatkę inokulowano zawiesiną trzech gatunków bakterii o tej samej gęstości 6×10^3 CFU/ml [36].

Na innym modelu, który miał odzwierciedlać *in vitro* warunki występujące w ranie, tzw. „colony-drip-flow reactor model", w którym biofilmy hodowano na membranie, nie obserwowano wzajemnego przylegania do siebie bakterii z następujących gatunków: *S. aureus* (szczep MRSA), *P. aeruginosa* i *Clostridium perfringens* pomimo, że w mikroskopie obserwowano typową trójwymiarową strukturę biofilmu. Liczba komórek MRSA i *C. perfringens* wynosiła około 10^7 CFU/membranę, natomiast liczba pałeczek *P. aeruginosa* przewyższała liczbę pozostałych dwóch gatunków bakterii o trzy rzędy wielkości. Poszczególne gatunki bakterii tworzyły odrębne warstwy w przekroju biofilmów [41].

Metody hodowlane są obecnie jeszcze niezastąpione przy ocenie ilościowej liczby bakterii różnorodnych gatunków w obrębie biofilmów. Metody molekularne, poza jedną – reakcją PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) nie pozwalają na rzetelną ocenę wzajemnych stosunków ilościowych poszczególnych jednostek taksonomicznych w obrębie biofilmów. Natomiast wykonanie ilościowej analizy składu gatunkowego złożonej populacji z użyciem RT-PCR jest zadaniem praktycznie niewykonalnym ze względu na wymagany znaczny nakład pracy. Zatem ilościowe badania składu gatunkowego biofilmów ograniczają się praktycznie do badania bakterii i grzybów dających się hodować na pożywkach laboratoryjnych [34]. Należy też uwzględnić fakt, że badania jakościowe z użyciem technik molekularnych są obarczone pewnym błędem wynikającym z stosowania w metodzie PCR i wszelkich jej odmianach starterów o sekwencjach zaczerpniętych z baz danych, w których gromadzone są najczęściej sekwencje DNA i RNA tych gatunków drobnoustrojów, które możliwe są do namnażania w laboratorium.

3. Wielogatunkowy biofilm płytki nazębnej

Skład wielogatunkowego biofilmu jamy ustnej jest charakterystyczny dla każdego człowieka. Jednostki taksonomiczne drobnoustrojów wchodzące w skład biofilmów jamy ustnej zostały już stosunkowo dobrze poznane. Wiedza ta została pozyskana z wykorzystaniem technik biologii molekularnej, których zastosowanie wydaje się być kluczowe dla badań tych konsorcjów. Techniki te pozwalają na wykrycie drobnoustrojów żywych lecz nie dających się hodować na bogatych w składniki odżywcze podłożach, stosowanych w laboratoriach mikrobiologicznych. Ponadto wprowadzenie oligonukleotydowych fragmentów DNA do genomu bakterii w określonych pozycjach umożliwiło uzyskanie fluorescencyjnego sygnału – GFP (green fluorescent protein), wówczas gdy badany gen ulega ekspresji. Technika ta wraz z transkryptomiką i proteomiką przyczyniła się do uzyskania wstępnych danych na temat interakcji i procesów metabolicznych zachodzących w złożonych konsorcjach drobnoustrojów [29, 40].

W skład biofilmów jamy ustnej wchodzi około ponad 600 różnych jednostek taksonomicznych bakterii, z których około 65,5% stanowią gatunki, które mogą być hodowane w laboratorium (Dewhirst [11], http://www.homd.org). Pozostałe jednostki taksonomiczne poznano dzięki analizie sekwencji ich DNA. Wiele z tych drobnoustrojów występuje jedynie w jamie ustnej, np. zaliczane do rodzaju TM7 [3]. Skład gatunkowy biofilmów nawet u jednego człowieka różni się w zależności od miejsca ich występowania w jamie ustnej. W jednym biofilmie może współistnieć około 100 gatunków bakterii właściwych dla danego osobnika. Jedną z istotnych technik biologii molekularnej, która umożliwiła poznanie różnorodności genetycznej bakterii w biofilmach jamy ustnej była technika RCCH (reverse-capture checkerboard hybridization), polegająca na amplifikacji fragmentów genów kodujących 16S rRNA, znakowanych digoksygeniną z całej populacji drobnoustrojów badanego biofilmu i następnie poddanie ich hybrydyzacji z oligonukleotydami komplementarnymi do wszystkich znanych sekwencji rDNA w formacie mikromacierzy [28, 31]. W wyniku analizy sekwencji genów 16S rRNA amplifikowanych z użyciem uniwersalnych starterów F24/Y36 stwierdzono, że podstawowymi typami (phylum) bakterii w biofilmach są *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* i *Fusobacteria*, do których należy 96% gatunków bakterii. Pozostałe 4% jednostek taksonomicznych należy do typów *Euryarchaeota*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, SR1, *Synergistetes*, *Tenericutes* i TM7 [11].

Bakterie różnych gatunków w obrębie tych biofilmów wchodzą ze sobą w złożone interakcje, przykładowo mogą to być oddziaływania synergistyczne lub współzawodnictwo, bez których gęstość bakterii poszczególnych gatunków w dojrzałym biofilmie byłaby jedynie wypadkową szybkości podziałów komórkowych bakterii poszczególnych gatunków [37]. Wśród bakterii wchodzących w skład biofilmów jamy ustnej wyróżnia się gatunki tzw. wczesnych i późnych kolonizatorów. Do gatunków wczesnych kolonizatorów zalicza się paciorkowce, oraz bakterie z rodzajów *Eikenella*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Propionibacterium* i *Veillonella*. Późnymi kolonizatorami są bakterie z następujących rodzajów *Eubacterium*, *Treponema* oraz *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum* [5].

Gatunki wczesnych kolonizatorów, występujące na powierzchni szkliwa w niewielkiej liczbie, tworzą już wielogatunkowy biofilm [26]. Próchnica zębów jest wynikiem metabolicznych procesów biofilmu płytki nazębnej, które zaburzyły równowagę mineralną powierzchni zęba, na której rosną drobnoustroje. Natomiast choroby przyzębia powstają na skutek wielorakich interakcji złożonego wielogatunkowego biofilmu z tkankami gospodarza, co prowadzi do utrwalenia stanu przewlekłej infekcji. Dla poznania patomechanizmów tkanek przyzębia zakażenia istotne będzie poznanie przestrzenno-czasowego występowania poszczególnych gatunków zarówno hodowalnych, jak i niehodowanych bakterii wielogatunkowego biofilmu płytki nazębnej. Już jest wiadomym, że komunikacja pomiędzy gatunkami bakterii zachodząca w obrębie tych biofilmów za pomocą cząsteczek autoinduktora-2 (AI-2), który jest wykrywany i/lub syntetyzowany przez bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie, jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju biofilmów jamy ustnej [35]. Niemniej istotna w rozwoju choroby jest odpowiedź gospodarza na obecność biofilmów w jamie ustnej, w postaci aktywowania mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej. Poznanie tych złożonych interakcji przybliży możliwość zwalczenia przewlekłych infekcji w jamie ustnej [30].

4. Wielogatunkowe biofilmy w wodzie

Innym przykładem stosunkowo dobrze poznanych wielogatunkowych biofilmów są konsorcja występujące w wodzie, w warunkach niskich stężeń składników odżywczych. Dla monitorowania składu gatunkowego tych biofilmów przydatne są metody określania różnorodności mikrobiologicznej ekosystemów, takie jak DGGE, czyli elektroforeza w żelu z użyciem czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis) i TRFLP, czyli polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (terminal restriction fragment lenght polymorphism). Metoda DGGE polega na amplifikacji fragmentów DNA z użyciem starterów bogatych w pary GC oraz ich analizie za pomocą elektroforezy w żelu o zwiększającym się stężeniu czynnika denaturującego. Liczba pozyskanych prążków świadczy o stopniu różnorodności badanego środowiska. Podobnie w metodzie TRFLP przedmiotem badań są amplikony pozyskane z wykorzystaniem specyficznych starterów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Analizie poddaje się pozycję miejsca restrykcyjnego najbliższego w stosunku do końca amplifikowanego fragmentu genu. Wynikiem takiej analizy jest charakterystyczny „odcisk palca" (fingerprint) badanej populacji drobnoustrojów. Techniki te z powodzeniem są też stosowane dla oceny różnorodności mikrobiologicznej środowiska gleby [14]. Wyniki przeprowadzonych ostatnio badań z wykorzystaniem tych metod wykazały wysoką zmienność sezonową i dynamikę wymiany gatunków w obrębie biofilmów występujących w rzekach [39].

Inne badania przeprowadzone z wykorzystaniem metody DGGE pozwoliły na ocenę szybkości i wydajności powstawania wielogatunkowego biofilmu na różnych materiałach wykorzystywanych do dystrybucji wody pitnej w systemach miejskich i pokazały, że największa różnorodność gatunkowa występuje w obrębie biofilmów powstałych na powierzchni rur stalowych w tych instalacjach. Ogółem pozyskano 176 kolonii bakterii, rosnących na podłożu R2A, spośród których 66% zaliczono do *Proteobacteria*, 20% nie zaklasyfikowano do żadnej jednostki taksonomicznej, 6% stanowiły *Actinobacteria*, 2% laseczki z rodzaju *Bacillus*, natomiast 6% drobnoustrojów nie oznaczono. Wśród *Proteobacteria* dominującym gatunkiem były pałeczki z rodzaju *Sphingomonas* [21]. Z perspektywy zdrowia publicznego istotnym zagadnieniem jest wzrost pałeczek *Legionella* w wielogatunkowych biofilmach w systemach dystrybucji wody. Pałeczka ta przejawia zdolność do bytowania w biofilmach, wykorzystując produkty rozpadu bakterii innych gatunków jako składniki odżywcze. Jednakże wiele badań wskazuje na to, że w obrębie wielogatunkowych biofilmów drobnoustrój ten nie namnaża się ze względu na brak dostępności L-cysteiny w odpowiednich stężeniach. Wydajne namnażanie pałeczek *Legionella* zachodzi wewnątrz komórek ameb z rodzajów *Naegleria*, *Acanthamoeba* i *Hartmanella*, które też bytują w obrębie biofilmów w środowisku wodnym [38]. Ostatnio wykazano, że w biofilmach występujących w systemach wody pitnej, oczyszczanej metodą filtracji membranowej, dochodzi do zwiększenia udziału patogennych pałeczek z rodzaju *Legionella* i *Chromobacterium* w wielogatunkowych biofilmach [27].

5. Wielogatunkowe biofilmy w środowisku przemysłowym

Wielogatunkowe biofilmy występują też w wielu instalacjach przemysłowych. W procesach przemysłowych, które są lub w najbliższej przyszłości będą wykorzystywane w praktyce w browarnictwie, bioremediacji i energetyce, podczas wytwarzania energii w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych, wzrost drobnoustrojów w postaci wielogatunkowych biofilmów przyspiesza bądź zwiększa wydajność pożądanych procesów technologicznych i może przynieść wyraźne korzyści ekonomiczne. Jednakże w innych gałęziach przemysłu, takich jak przemysł spożywczy, farmaceutyczny i maszynowy występowanie biofilmów przynosi wyraźne straty ekonomiczne i powoduje trudności w utrzymaniu odpowiedniej higieny środowiska pracy a także wydajnego

przebiegu procesów technologicznych, których istotnymi elementami są systemy dystrybucji wody [24].

W przemyśle maszynowym biofilmy występujące na ściankach zbiorników, na opiłkach metali, w wanienkach tokarek i szlifierek przyczyniają się do skażenia płynów chłodząco-smarujących wykorzystywanych podczas obróbki metali i w znacznym stopniu wpływają na pogorszenie jakości wytwarzanych wyrobów metalowych. Stwarzają też poprzez swoją tolerancję na biocydy wyraźne zagrożenie dla zdrowia pracowników tej gałęzi przemysłu, ponieważ umożliwiają przetrwanie osiadłych populacji bakterii podczas zabiegów mycia i konserwacji maszyn, a następnie ponowne namnożenie się drobnoustrojów, w tym wielu gatunków chorobotwórczych bakterii do wysokiej gęstości (10^7–10^8 CFU/ml) w płynnych chłodziwach. Chłodziwa te w procesie obróbki metali rozpraszane są w postaci mgły olejowej, bioaerozolu, który umożliwia wnikanie drobnoustrojów lub produktów ich rozpadu (LPS, kwasy tejchojowe) do dróg oddechowych, stanowiąc przez to bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia pracowników. W biofilmach rosnących w układach chłodziw zaobserwowano ciekawe zjawisko ograniczonej różnorodności gatunkowej, nawet wówczas gdy badania prowadzono za pomocą technik metagenomiki. Dominującymi gatunkami w tych konsorcjach są pałeczki z rodziny *Pseudomonaceae*, wraz z innymi pałeczkami Gram-ujemnymi, takimi jak *Shewanella putrefaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Comamonas testosteroni*, *Morganella morganii* i *Citrobacter freundii* [17]. Niepokojącym zjawiskiem jest występowanie w obrębie tych wielogatunkowych konsorcjów w zbiornikach chłodziw niektórych gatunków prątków szybkorosnących, takich jak: *M. immunogenum*, *M. chelonae*/*M. abscessus* i *M. diernhoferi*. Prątki te nawet w hodowli planktonowej przejawiają oporność na biocydy, która wyraźnie zwiększa się podczas wzrostu tych drobnoustrojów w postaci biofilmu [23]. Wówczas, ich wysoka tolerancja na środki bójcze prowadzi do liczbowej dominacji tych bakterii w wielogatunkowych biofilmach zbiorników i instalacji dystrybucji chłodziw, w których stosowano biocydy uwalniające formaldehyd jako środek przeciwbakteryjny. Dotychczas opisano już 27 wybuchów epidemicznych alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych (hypersensitivity pneumonitis) w zakładach przemysłowych, w których z chłodziw pozyskano metodami hodowlanymi lub wykryto w nich za pomocą technik molekularnych obecność tych prątków [4].

Natomiast nie zawsze wielogatunkowe biofilmy bytujące w środowisku przemysłowym wiążą się ze zjawiskami niekorzystnymi dla człowieka ze względów ekonomicznych lub zdrowotnych. Ogromne nadzieje na pozyskanie alternatywnych źródeł energii wzbudzają ostatnio badania naukowe podjęte w celu pozyskania mikrobiologicznych ogniw paliwowych, w których zarówno anodę jak i katodę stanowić będą konsorcja bakterii, wielogatunkowe biofilmy, ściśle zdefiniowane gatunkowo [20]. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe działają na zasadzie przekształcania energii chemicznej zawartej w związkach organicznych (np. odpadach przemysłowych, morskich osadach dennych) w energię elektryczną przy udziale złożonych konsorcjów bakterii [13]. Na powierzchni anod, które instalowano w morskich osadach dennych występowały w przeważającej liczbie przedstawiciele następujących grup bakterii: *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Rhizobiales* i *Clostridia*. Większość z tych drobnoustrojów identyfikowano za pomocą technik molekularnych. Podjęto szereg badań zmierzających do izolacji gatunków bakterii, które w jednogatunkowym biofilmie, po odpowiednich modyfikacjach genetycznych, w sposób o wiele wydajniejszy niż wielogatunkowe konsorcja uczestniczyłyby w wytwarzaniu energii na powierzchni. Wyniki badań porównawczych wydajności obu rodzajów biofilmów; jedno- i wielogatunkowych nie są jednoznaczne, choć już teraz wielu autorów podkreśla, że znajomość wzajemnych interakcji pomiędzy drobnoustrojami jest konieczna dla efektywnego wykorzystania potencjału wielogatunkowych biofilmów w procesie wytwarzania energii. Właśnie dla aplikacji wiedzy o biofilmach w „energetyce przyszłości" bardzo istotne jest pozyskanie wiedzy o powtarzalnym procesie rozwoju wielogatunkowych biofilmów o odpowiednich proporcjach liczbowych komórek drobnoustrojów, wchodzących w skład tych biofilmów [18]. Porównano wydajność wytwarzania prądu przez pięć gatunków bakterii, takich jak *Geobacter sulfurreducens*, *P. aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, *Clostridium acetobutilicum* i *E. faecium* rosnących w jednogatunkowych biofilmach lub w wielogatunkowym biofilmie pałeczek Gram-ujemnych i *E. faecium* rosnących na powierzchni anody w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym i stwierdzono, że najwyższą wydajność miał biofilm wielogatunkowy. Może być to uwarunkowane zdolnością bakterii Gram-dodatnich do wykorzystywania mediatorów (nośników elektronów) wytwarzanych przez *P. aeruginosa* lub też aktywnym udziałem systemu quorum sensing w tym procesie [32].

6. Wielogatunkowe biofilmy a rozwój zakażeń

Badania występujących w jamach ciała i tkankach człowieka wielogatunkowych biofilmów, aczkolwiek jeszcze nieliczne, już weryfikują akceptowane szeroko poglądy na patogenezę niektórych zakażeń. Opisano ostatnio doświadczenia, w których hodowano biofilmy *Candida albicans*, *Streptococcus oralis*, *S. gordonii* i *S. sanguinis in vitro* na modelu nabłonka jamy ustnej. Modelowa tkanka nabłonkowa złożona była z dwóch typów komórek: keratynocytów linii OKF6/TERT-2 hodowanych wraz z rosnącymi na kolagenie typu I

fibroblastach linii 3T3, które hodowano w ciągu 2–3 tygodni. Na powierzchni tak przygotowanej tkanki, przypominającej nabłonek wielowarstwowy płaski (stratified squamous epithelia) inokulowano zawieszone w pobranej od ochotników ślinie komórki *C. albicans* o gęstości 10^6 CFU/ml i *S. oralis* o gęstości 10^7 CFU/ml, w ciągu 30 min. przy przepływie o średniej prędkości 100 µl/min. Czas hodowli biofilmów wynosił maksymalnie 24 godziny. Wyniki tych eksperymentów pokazały, że w obecności *C. albicans* paciorkowce tworzą wydajniej biofilm niż podczas wzrostu w postaci jednogatunkowego biofilmu. Jednocześnie ich obecność indukuje proces inwazji tkanki nabłonkowej przez strzępki grzyba. Zgodnie z opinią autorów obserwacje te przeczą akceptowanemu dotychczas poglądowi, że obecność komensalnych bakterii zapobiega rozwojowi kandydozy w jamie ustnej [12].

Inne badania dwugatunkowych biofilmów bezotoczkowego szczepu *Haemophilus influenzae* (NTHi) i szczepu *Streptococcus pneumoniae*, pozyskanych od chorego z przewlekłym zapaleniem nosogardła podważyły pogląd o wzajemnej konkurencji pomiędzy tymi dwoma gatunkami bakterii w drogach oddechowych człowieka. Wyniki tych badań sugerują, że wzajemne oddziaływania obu tych gatunków obrębie biofilmu wzmagają ekspresję genu *pil*A, kodującego pilinę, białko fimbrii typu IV, odpowiedzialne u szczepów NTHi za przyleganie do nabłonka. W dwugatunkowym biofilmie dochodzi też do wzmożenia syntezy oksydazy pirogronianu, która u pneumokoków warunkuje wytwarzanie nadtlenku wodoru. W tych warunkach wzrostu dochodzi także do zahamowania ekspresji genów *ply* i *pav*A, kodujących u pneumokoków odpowiednio pneumolysinę i adhezynę A (pneumococcal adherence factor A). Obserwacje te mogą stanowić wsparcie hipotezy o występowaniu zjawiska populacyjnej wirulencji w złożonych konsorcjach drobnoustrojów w trakcie przebiegu przewlekłych zakażeń [7]. Po raz pierwszy hipotezę o możliwości indukcji lub supresji wirulencji w wielogatunkowych biofilmach wysnuli Jenkinson i Lamont [22], omawiając rolę złożonych konsorcjów drobnoustrojów w zdrowiu i podczas zakażeń jamy ustnej. Hipoteza ta jest obecnie weryfikowana zarówno w odniesieniu do patogenów zwierzęcych i człowieka, jak i patogenów roślin [16].

8. Podsumowanie

Techniki molekularne, takie jak sekwencjonowanie oraz analiza wielkości fragmentów restrykcyjnych lub amplikonów DNA pozyskanych techniką PCR umożliwiają obecnie poznanie podstawowych jednostek taksonomicznych drobnoustrojów wchodzących w skład wielogatunkowych biofilmów. Jednakże metody te pozwalają jedynie na ocenę jakościową, a nie ilościową tych złożonych konsorcjów drobnoustrojów. Metody mikroskopowe, a zwłaszcza mikroskopia konfokalna w połączeniu z techniką FISH umożliwia poznanie trójwymiarowych struktur wielogatunkowych biofilmów, a także umiejscowienia poszczególnych gatunków w obrębie mikrokolonii lub biofilmów typu „colony blot". Obecnie w stosunkowo najmniejszym stopniu poznane są wzajemne oddziaływania drobnoustrojów w wielogatunkowych biofilmach. Związane jest to ze złożonością analiz chemicznych, biochemicznych lub immunochemicznych, koniecznych do monitorowania całkowitej aktywności metabolicznej tych złożonych konsorcjów. Z tego też względu, choć fakt występowania licznych wzajemnych oddziaływań pomiędzy komórkami bakterii w wielogatunkowych biofilmach uważa się za dobrze udokumentowany, to nadal ocena udziału poszczególnych gatunków bakterii, a zwłaszcza sposobów regulacji określonych szlaków metabolicznych, które mogą prowadzić do większej zjadliwości drobnoustrojów w wielogatunkowych biofilmach stanowi wyzwanie dla uczonych prowadzących badania tych złożonych konsorcjów. Badania te są kluczowe dla wyjaśnienia wielu zjawisk zachodzących w środowisku, przemyśle a także podczas rozwoju przewlekłych i nawracających zakażeń, które w znacznym odsetku przebiegają z udziałem wielogatunkowych biofilmów.

Piśmiennictwo

1. Almeida C., Azevedo N.F., Santos S., Keevil C.W., Vieira M.J.: Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS One*, **6**, e14786 (2011)
2. Amann R., Fuchs B.M.: Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol*. **6**, 339–348 (2008)
3. Brinig M.M., Lepp P.W., Ouverney C.C., Armitage G.C., Relman D.A.: Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. *Appl. Environ. Microbiol*. **69**, 1687–1694 (2003)
4. Burton C.M., Crook B., Scaife H., Evans G.S., Barber C.M.: Systematic review of respiratory outbreaks associated with exposure to water-based metalworking fluids. *Ann. Occup. Hyg*. **56**, 374–388 (2012)
5. ten Cate J.M.: Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*, **94**, 1–9 (2006)
6. Coenye T., Nelis H.J.: In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, **83**, 89–105 (2010)
7. Cope E.K., Leid J.G. i wsp.: Regulation of virulence gene expression resulting from *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae* interactions in chronic disease. *PLoS One*, **6**, e28523 (2011)
8. Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J.: Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol*. **41**, 435–64 (1987)
9. Costerton J.W.: The biofilm primer. Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, 2007

10. Dalton T., Dowd S.E., Wolcott R.D., Sun Y., Watters C., Griswold J.A., Rumbaugh K.P.: An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS One,* **6**, e27317 (2011)
11. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G.: The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* **192**, 5002–5017 (2010)
12. Diaz P.I., Xie Z., Sobue T., Thompson A., Biyikoglu B., Ricker A., Ikonomou L., Dongari-Bagtzoglou A.: Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel *in vitro* mucosal model. *Infect. Immun.* **80**, 620–632 (2012)
13. Franks A.E., Malvankar N., Nevin K.P.: Bacterial biofilms: the powerhouse of a microbial fuel cel. *Biofuels*, **1**, 589–604 (2010)
14. Frąc M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
15. Fröjd V., Chávez de Paz L., Andersson M., Wennerberg A., Davies J.R., Svensäter G.: In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces. *Mol. Oral Microbiol.* **26**, 241–252 (2011)
16. Galiana E., Marais A., Mura C., Industri B., Arbiol G., Ponchet M.: Ecosystem screening approach for pathogen-associated microorganisms affecting host disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6069–6075 (2011)
17. Gilbert Y., Veillette M., Duchaine C.: Metalworking fluids biodiversity characterization. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 437–449 (2010)
18. Greenman J., Ieropoulos J., Melhuish C.: Microbial fuel cells – scalability and their use in robotics. Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine I. *Modern Aspects Electrochem.* **52**, 239–290 (2011)
19. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
20. He Z., Angenent L.T.: Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis*, **18**, 2009–2015 (2006)
21. Jang H.J., Choi Y.J., Ka J.O.: Effects of diverse water pipe materials on bacterial communities and water quality in the annular reactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 115–123 (2011)
22. Jenkinson H.F., Lamont R.J.: Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* **13**, 589–595 (2005)
23. Kapoor R., Yadav J.S.: Expanding the mycobacterial diversity of metalworking fluids (MWFs): evidence showing MWF colonization by *Mycobacterium abscessus. FEMS Microbiol. Ecol.* **79**, 392–399 (2012)
24. Karunakaran E., Mukherjee J., Ramalingam B., Biggs C.A.: „Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1869–1881 (2011)
25. Klug B., Rodler C., Koller M., Wimmer G., Kessler H.H., Grube M., Santigli E.: Oral biofilm analysis of palatal expanders by fluorescence in-situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *J. Vis. Exp.* **20**, pii: 2967 (2011)
26. Kolenbrander P.E.: Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int. J. Oral Sci.* **3**, 49–54 (2011)
27. Kwon S., Moon E., Kim T.S., Hong S., Park H.D.: Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant. *Microbes Environ.* **26**, 149–155 (2011)
28. Lima K.C., Coelho L.T., Pinheiro I.V., Rôças I.N., Siqueira J.F. Jr.: Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res.* **45**, 21–30 (2011)
29. Nicolle O., Rouillon A., Guyodo H., Tamanai-Shacoori Z., Chandad F., Meuric V., Bonnaure-Mallet M.: Development of SNAP-tag-mediated live cell labeling as an alternative to GFP in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 357–363 (2010)
30. Palmer R.J., Darveau R., Lamont R.J., Nyvad B., Teles R.P.: Human oral bacterial biofilms: composition, dynamics, and pathogenesis. (w) Biofilm infections, red. T. Bjarnsholt, C. Moser, P.Ø. Jensen, N. Høiby, Springer, New York 2010, str. 35–68
31. Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E.: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol. 2000*, **42**, 80–87 (2006)
32. Read S.T., Dutta P., Bond P.L., Keller J., Rabaey K.: Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. *BMC Microbiol.* **1**, 98 (2010)
33. Rumbaugh K.P., Carty N.L.: In vivo models of biofilm infection. (w) Biofilm infections, red. T. Bjarnsholt, C. Moser, P.Ø. Jensen, N. Høiby, Springer, New York 2010, str. 267–290
34. Qian P.Y., Lau S.C., Dahms H.U., Dobretsov S., Harder T.: Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Mar. Biotechnol.* (*NY*), **9**, 399–410 (2007)
35. Saenz G.C., Rao D., Underwood A., Belapure S.A., Campagna S.R., Sun Z., Tammariello S., Rickard A.H.: Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiology*, mic.0.057182-0, doi:10.1099/mic.0.057182-0 (2012)
36. Stoodley P., Sidhu S., Nistico L., Mather M., Boucek A., Hall-Stoodley L., Kathju S.: Kinetics and morphology of polymicrobial biofilm formation on polypropylene mesh. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* w druku (2012)
37. Trafny E.A.: Wzajemne interakcje drobnoustrojów w wielogatunkowych biofilmach. *Forum Zakażeń*, **3**, 13–17 (2012).
38. Taylor M., Ross K., Bentham R.: *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb. Ecol.* **58**, 538–547 (2009)
39. Wey J.K., Jürgens K., Weitere M.: Seasonal and successional influences on bacterial community composition exceed that of protozoan grazing in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2013–2024 (2012)
40. Williamson K.S., Richards L.A., Perez-Osorio A.C., Pitts B., McInnerney K., Stewart P.S., Franklin M.J.: Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J. Bacteriol.* **194**, 2062–2073 (2012)
41. Woods J., Boegli L., Kirker K.R., Agostinho A.M., Durch A.M., de Lancey Pulcini E., Stewart P.S., James G.A.: Development and application of a polymicrobial, in vitro, wound biofilm model. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 998–1006 (2012)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 213–217
http://www.pm.microbiology.pl

DIAGNOSTYKA OSTRYCH ZAKAŻEŃ GÓRNYCH DRÓG ODDECHOWYCH (GDO) – DOBÓR MATERIAŁÓW I PROBLEMY INTERPRETACYJNE ZWIĄZANE Z OBECNOŚCIĄ FLORY FIZJOLOGICZNEJ I NOSICIELSTWEM

Tekst wykładu przedstawionego na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie w dniach 5–8 września 2012 r.

Elżbieta Mazur*

Katedra Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, tel. 81 742 3785

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Dobór materiałów do badań mikrobiologicznych w zapaleniach gdo. 3. Ostre zapalenie gardła i migdałków podniebiennych. 4. Ostre zapalenie ucha środkowego oraz jam nosowych i zatok przynosowych. 5. Materiały nieodpowiednie do diagnostyki zapaleń gdo i błędy interpretacyjne. 6. Podsumowanie

Microbiological diagnosis of acute upper respiratory tract infections: choice of specimens and interpretation problems due to the presence of normal nasopharyngeal flora and carrier state

Abstract: Microbiological diagnosis can help to establish the etiological factor of acute pharyngotonsillitis, otitis media and sinusitis only of appropriate specimens have been collected. Since relevant specimens for the diagnosis of otitis media and sinusitis have to be obtained with the usage of invasive procedures, microbiological diagnosis in both diseases is not routinely recommended. Administration of antibiotic therapy depends on clinical examination and the course of infection. The choice of antibiotic should be based on the recommendations. In Poland, the antibiotic of choice to treat acute bacterial otitis media and sinusitis is amoxicillin. In acute pharyngotonsillitis, microbiological examination is essential to confirm streptococcal etiology. It is not required if clinical examination suggests viral pharyngitis. To confirm or exclude streptococcal pharyngitis, throat swab should be obtained to perform rapid antigen detection test (RADT) or culture. Only patients with microbiologically confirmed streptococcal pharyngitis should be treated with antibiotic. Penicillin is the drug of choice to treat streptococcal pharyngotonsillitis. Inappropriate specimens should not be the subject of microbiological examination. The results of microbiological examination should provide physicians with interpretation, they cannot only contain the list of cultured bacteria. The discrimination should be done between etiological factors, normal flora and carrier state. Such approach can decrease unnecessary antibiotic use in the treatment of acute upper respiratory tract infections. It can also curtail the increasing antibiotic resistance among respiratory pathogens.

1. Introduction. 2. The choice of appropriate specimens for microbiological diagnosis of upper respiratory tract infections. 3. Acute pharyngotonsillitis. 4. Acute otitis media and sinusitis. 5. Inappropriate specimens for microbiological diagnosis of upper respiratory tract infections and interpretation errors. 6. Summary

Słowa kluczowe: ostre zapalenie gardła i migdałków podniebiennych, ostre zapalenie ucha środkowego, ostre zapalenie zatok, diagnostyka mikrobiologiczna
Key words: acute pharyngotonsillitis, acute otitis media, acute sinusitis, microbiological diagnosis

1. Wstęp

Do najczęstszych ostrych zakażeń górnych dróg oddechowych należą zapalenie gardła i migdałków podniebiennych, zapalenie ucha środkowego oraz zapalenie jam nosowych i zatok przynosowych. Większość ostrych zapaleń górnych dróg oddechowych wywołują wirusy, zakażenia bakteryjne stanowią wśród nich zdecydowaną mniejszość [6, 16, 26, 27]. Ostre zapalenia gdo rozpoznajemy na podstawie zespołu objawów, który nie jest charakterystyczny dla drobnoustroju wywołującego zakażenie i często nie pozwala na odróżnienie etiologii wirusowej od bakteryjnej. Jednak, aby właściwie leczyć ostre zapalenia gdo musimy znać odpowiedź na dwa podstawowe pytania:

1) Czy jest to zakażenie wirusowe czy bakteryjne, a więc czy powinniśmy zastosować tylko leczenie objawowe czy należy włączyć antybiotyk?
2) Jeśli zakażenie wywołała bakteria, to jaka: jaki gatunek, jaki profil wrażliwości na antybiotyki, a zatem jaki antybiotyk należy zastosować, w jakiej dawce, jakie są jego właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, jakie są ograniczenia ze strony pacjenta do jego zastosowania, jakie antybiotyki drugiego i trzeciego rzutu możemy zastosować? [15]

Pomocne dla udzielenia odpowiedzi na te pytania może być badanie mikrobiologiczne. Jednak może ono pomóc odpowiedzieć na te pytania tylko wówczas, jeśli pobierzemy materiał adekwatny dla danego zakażenia [15, 24].

2. Dobór materiałów do badań mikrobiologicznych w zapaleniach gdo

Adekwatnymi materiałami do badań mikrobiologicznych są:

1) w zapaleniu gardła i migdałków podniebiennych: wymaz z gardła (powierzchnia obu migdałków i tylna ściana gardła),

* Autor korespondencyjny: e-mail: elamazur@yahoo.com

2) w ostrym zapaleniu ucha środkowego (OZUŚ): płyn z jamy ucha środkowego, pobierany poprzez nacięcie błony bębenkowej albo wyciekający po jej samoistnej perforacji,
3) w ostrym zapaleniu jam nosowych i zatok przynosowych (OZZP): punktat z zatoki lub materiał pobrany podczas endoskopii [16].

W ostrych zapaleniach gdo jedynym materiałem możliwym do pobrania nieinwazyjnie jest wymaz z gardła. Z uwagi na konieczność użycia technik inwazyjnych, diagnostyka bakteriologiczna w ostrym zapaleniu zatok i ucha środkowego nie jest rutynowo zalecana. Wyjątek stanowią przypadki OZUŚ w których stwierdzamy wyciek z ucha. W pozostałych przypadkach OZUŚ i OZZP wskazania do antybiotykoterapii ustala się na podstawie objawów klinicznych oraz przebiegu zakażenia, stosuje się wówczas antybiotykoterapię empiryczną zgodną z rekomendacjami [16].

Jama nosowo-gardłowa, jedyne miejsce w gdo, z którego można pobrać materiał w sposób nieinwazyjny, nie jest strefą jałową. Występuje w niej flora fizjologiczna, wśród której, jako konsekwencja zjawiska nosicielstwa, okresowo, krócej bądź dłużej, mogą być obecne również drobnoustroje potencjalnie patogenne, wśród nich *Staphylococcus aureus* oraz najważniejsze patogeny bakteryjne zapaleń ucha środkowego i zatok: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* [7, 11, 17, 19, 28, 34, 37, 40–42]. Należy pamiętać, że wyhodowanie tych bakterii z wymazu pobranego z przedsionka nosa lub z gardła nie upoważnia do uznania ich za czynniki etiologiczne ostrego zapalenia gardła, ucha środkowego czy zatok [16, 22].

3. Ostre zapalenie gardła i migdałków podniebiennych

Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi ostrego zapalenia gardła i migdałków są wirusy oddechowe, wśród nich: rinowirusy, koronawirusy, adenowirusy, wirusy Coxackie A, wirusy grypy, paragrypy, RSV oraz wirusy należące do rodziny *Herpesviridae* [16, 26, 33]. Najważniejszym patogenem bakteryjnym jest *Streptococcus pyogenes* (paciorkowiec beta-hemolizujący grupy A). Paciorkowce beta-hemolizujące, należące do innych grup (głównie C i G) izolowane są znacznie rzadziej [9, 16, 20, 36]. Inne bakterie bywają przyczyną ostrego zapalenia gardła i migdałków jedynie sporadycznie (*Neisseria gonorrhoeae, Corynebacterium diphtheriae*), nie są zatem przedmiotem rutynowej diagnostyki [16]. *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis* nie są czynnikami etiologicznymi ostrego zapalenia gardła i migdałków podniebiennych [16, 24].

W praktyce różnicujemy zatem etiologię wirusową od paciorkowcowej. Służy temu zarówno wnikliwe badanie kliniczne i wywiad, jak też badanie mikrobiologiczne, które należy wykonać wówczas, gdy na podstawie badania klinicznego podejrzewamy etiologię paciorkowcową. Dane epidemiologiczne oraz niektóre objawy kliniczne mogą wskazywać na wyższe prawdopodobieństwo zakażenia paciorkowcowego, jednak diagnoza musi być potwierdzona badaniem mikrobiologicznym. Paciorkowcowe zapalenie gardła i migdałków występuje częściej u dzieci w wieku od 3 do 14 lat. U chorych z etiologią paciorkowcową częściej obserwuje się ból podczas przełykania, gorączkę oraz powiększone węzły chłonne szyjne. U dzieci często występuje ból głowy, nudności, wymioty i ból brzucha. Migdałki podniebienne są zaczerwienione i obrzęknięte. Na podniebieniu miękkim mogą pojawić się drobne wybroczyny. Żaden z tych objawów jednak nie jest specyficzny dla zakażenia paciorkowcowego. Natomiast brak gorączki, kaszel, chrypka, zapalenie spojówek, katar, wysypka oraz obecność biegunki wskazują na zakażenie wirusowe [3, 5, 16, 33].

Za najbardziej przydatną praktyczną skalę oceniającą prawdopodobieństwo zakażenia *S. pyogenes* zarówno u dorosłych, jak i u dzieci, polskie „Rekomendacje postępowania w pozaszpitalnych zakażeniach układu oddechowego 2010" uznają skalę Centora w modyfikacji McIssaca [16]. Przedstawia ją tabela I.

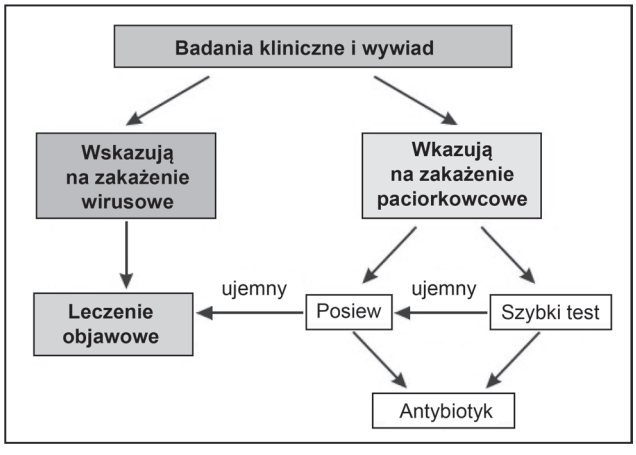
Należy podkreślić, że o ile na podstawie badania klinicznego można rozpoznać etiologię wirusową (0–1 punktów w skali Centora/McIssaca), o tyle nie jest ono wystarczające do rozpoznania anginy paciorkowcowej. Aby rozpoznać anginę paciorkowcową, a co za tym idzie wdrożyć leczenie antybiotykiem, niezbędne jest wykonanie badania mikrobiologicznego [5, 16, 23, 43]. Zatem u chorych, którzy otrzymali 2 lub więcej punktów w skali Centora/McIssaca, rozpoznanie paciorkowcowego zapalenia gardła i migdałków stawia się na podstawie badania mikrobiologicznego, a więc wyniku posiewu wymazu z gardła lub szybkiego testu, wykrywającego antygen grupowy *S. pyogenes* (RADT – rapid antigen detection test) [3, 5, 8, 16, 33, 35, 43]. Materiałem do wykonania obu badań jest wymaz

Tabela I
Skala punktowa oceny prawdopodobieństwa zakażenia *S. pyogenes* wg Centora/McIssaca
(wg Hryniewicz W. i wsp. [16], reprodukowane za zgodą)

Parametr	Liczba punktów
Gorączka > 38°C	1
Brak kaszlu	1
Powiększone węzły chłonne szyjne przednie	1
Nalot włóknikowy i obrzęk migdałków	1
Wiek 3–14 lat	1
Wiek 15–44 lata	0
Wiek > 45 lat	–1

z gardła. Powinien on być pobrany z powierzchni obu migdałków i z tylnej ściany gardła [3, 5, 16, 33, 38, 43]. Posiew wymazu z gardła pozostaje złotym standardem w rozpoznawaniu paciorkowcowego zapalenia gardła i migdałków, jego czułość wynosi 90–95% [16, 32, 43]. Niedogodnością tego badania jest konieczność oczekiwania na wynik co najmniej jedną dobę [5, 43]. Szybkie testy, choć droższe od posiewu, pozwalają na uzyskanie wyniku w ciągu kilku minut [5, 21, 43]. Dostępne obecnie szybkie testy cechują się wysoką swoistością (> 95%) i czułością w granicach 70%–90% [16, 32, 43]. Wysoka swoistość szybkiego testu oznacza, iż na podstawie dodatniego wyniku RADT możemy wdrożyć antybiotykoterapię. Jednakże, z uwagi na niższą czułość, ujemny wynik szybkiego testu nie wyklucza etiologii paciorkowcowej, dlatego powinien być potwierdzony hodowlą [8, 14, 16, 24, 43]. Zalecenie to powinno być bezwzględnie przestrzegane u dzieci, gdyż u nich prawdopodobieństwo wystąpienia etiologii paciorkowcowej jest znacznie wyższe niż u dorosłych [16]. Fałszywie dodatnie RADTs zdarzają się bardzo rzadko. Wynika to z faktu, iż niektóre szczepy *Streptococcus milleri* (pochodzące z flory fizjologicznej jamy ustnej i gardła) mogą mieć na swojej powierzchni antygen grupowy A, dlatego, jeśli pacjent jest skolonizowany takimi szczepami, test może dawać wynik dodatni mimo braku *S. pyogenes* [18, 30]. Niestety, ani posiew ani RADTs, nie są w stanie odróżnić jednoznacznie chorych z ostrym paciorkowcowym zapaleniem gardła od nosicieli *S. pyogenes*, którzy przechodzą wirusowe zapalenie gardła [31]. Dlatego, jeśli obraz kliniczny wskazuje na zakażenie wirusowe (0–1 punktów w skali Centora/McIssaca) nie jest zalecane wykonywanie badania mikrobiologicznego, gdyż w takich przypadkach wykrycie *S. pyogenes* w wymazie z gardła skutkuje „leczeniem" nosicielstwa, a nie aktualnie toczącego się zakażenia [5, 27].

Algorytm postępowania w ostrym zapaleniu gardła i migdałków przedstawia rys. 1.



Ryc. 1. Algorytm różnicowania i leczenia ostrego zapalenia gardła i migdałków podniebiennych (wg Mazur E. [24], reprodukowany za zgodą wydawnictwa Borgis)

Wirusowe zapalenie gardła należy leczyć wyłącznie objawowo. Penicylina, podawana doustnie lub domięśniowo, jest obecnie antybiotykiem z wyboru w leczeniu paciorkowcowego zapalenia gardła i migdałków podniebiennych [2, 16, 25, 26, 43].

4. Ostre zapalenie ucha środkowego oraz jam nosowych i zatok przynosowych

Według aktualnego stanu wiedzy, pierwotną przyczyną ostrego zapalenia ucha środkowego (OZUŚ) i zatok (OZZP) są wirusy, wśród nich najważniejszą rolę odgrywają rinowirusy, RSV, koronawirusy, adenowirusy, wirusy grypy i paragrypy [6, 16]. Zdecydowana większość bakteryjnych OZUŚ jest wywoływana przez *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis.* Najczęstsze patogeny bakteryjne OZZP to: *S. pneumoniae* i *H. influenzae*, a następnie *M. catarrhalis, S. pyogenes, S. aureus* oraz bakterie beztlenowe. Najważniejszym patogenem bakteryjnym obu schorzeń pozostaje *S. pneumoniae* [4, 10, 12, 13, 16, 22, 26, 27, 29, 37].

Rozpoznanie OZUŚ stawia się na podstawie ostrych objawów choroby, takich jak ból lub wyciek z ucha, katar, kaszel, gorączka. Decydujący dla rozpoznania jest obraz otoskopowy, w którym stwierdza się obecność płynu w uchu środkowym i zmiany zapalne błony bębenkowej [4, 12, 16, 27, 29, 39]. Jednak żaden z tych objawów nie jest swoisty dla zakażenia wirusowego lub bakteryjnego. Łagodne klinicznie przypadki traktowane są obecnie jako zapalenia o etiologii wirusowej i powinny podlegać zasadzie czujnego wyczekiwania bez podawania antybiotyku [6, 16, 27, 29, 31]. Stosujemy wówczas leczenie przeciwbólowe i przeciwgorączkowe [10, 12, 16, 26, 31].

Różnicowanie między wirusowym i bakteryjnym zapaleniem zatok jest utrudnione ze względu na brak specyficznych dla etiologii objawów. Rodzaj wydzieliny z nosa, w szczególności jej ropny charakter, nie świadczy o zakażeniu bakteryjnym i nie powinien stanowić kryterium różnicującego. Podobnie mało różnicującym objawem jest gorączka. Ponieważ zakażenie bakteryjne prawie zawsze poprzedza infekcja wirusowa, większe znaczenie różnicujące ma ocena ewolucji zmian. Objawy infekcji wirusowej ustępują na ogół w ciągu 7– 10 dni. U dzieci utrzymywanie się objawów zakażenia górnych dróg oddechowych dłużej niż 10 dni wskazuje na zakażenie bakteryjne [16, 27].

Materiałem do badań mikrobiologicznych w OZUŚ jest płyn z jamy ucha środkowego, pobierany poprzez nacięcie błony bębenkowej albo wyciekający po jej samoistnej perforacji. W OZZP właściwym materiałem do badań jest punktat z zatoki lub materiał pobrany podczas endoskopii [13, 16, 22, 26]. Rutynowo, zwłaszcza u chorych leczonych ambulatoryjnie, diagnostyka

bakteriologiczna w ostrym zapaleniu zatok i ucha środkowego nie jest zalecana [13, 16, 26, 29, 39]. Wynika to z faktu, że aby pobrać materiał adekwatny do zdiagnozowania tych zakażeń, niezbędne są procedury inwazyjne. Wyjątek stanowią przypadki OZUŚ w których stwierdzamy wyciek z ucha. Wydzielina z ucha, pobrana przy użyciu jałowego wziernika, po uprzednim odkażeniu przewodu słuchowego zewnętrznego, powinna być zawsze poddana badaniu mikrobiologicznemu [16, 26]. Należy pamiętać, że wymaz z gardła i przedsionka nosa nie są materiałami adekwatnymi do badań mikrobiologicznych w OZUŚ i OZZP [16, 22, 24, 26].

Natychmiastowe zastosowanie antybiotyku w OZUŚ jest zalecane:
- u dzieci poniżej 6 miesiąca życia,
- u dzieci z wysoką gorączką i wymiotami,
- u dzieci poniżej 2 roku życia z obustronnym OZUŚ,
- u chorych z wyciekiem z ucha [16].

Zastosowanie antybiotyku w OZZP jest zalecane w następujących sytuacjach:
- ciężki przebieg zakażenia określony intensywnością bólu twarzoczaszki oraz gorączką powyżej 39°C,
- brak poprawy po 7–10 dniach,
- objawy pogorszenia po wstępnej poprawie klinicznej,
- wystąpienie powikłań [16].

Z uwagi na fakt, iż w większości przypadków OZUŚ i OZZP nie wykonujemy badania bakteriologicznego, w sytuacjach, w których wskazane jest wdrożenie antybiotyku, powinniśmy zastosować antybiotykoterapię empiryczną. Antybiotyk stosowany do leczenia OZUŚ i OZZP powinien być skuteczny wobec najczęściej występujących patogenów, a więc przede wszystkim *S. pneumoniae* i *H. influenzae*. Uwzględniając profil lekooporności tych drobnoustrojów w Polsce, lekiem z wyboru powinna być amoksycylina w dużych dawkach [6, 16].

5. Materiały nieodpowiednie do diagnostyki zapaleń gdo i błędy interpretacyjne

Wymaz z gardła i przedsionka nosa nie są materiałami odpowiednimi do badań mikrobiologicznych w OZUŚ i OZZP [16, 22, 24, 26]. Wymaz z gardła służy do różnicowania anginy paciorkowcowej od wirusowego zapalenia gardła, natomiast nie jest to materiał odpowiedni do diagnostyki zapalenia zatok lub ucha środkowego [16, 24, 26]. Wymaz z przedsionka nosa jest materiałem odpowiednim do stwierdzenia nosicielstwa gronkowca złocistego, nie jest to jednak materiał odpowiedni do zdiagnozowania jakiegokolwiek ostrego zakażenia dróg oddechowych [16, 24]. Wyhodowanie *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis* w wymazie z przedsionka nosa lub z gardła nie upoważnia do uznania ich za czynniki etiologiczne ostrego zapalenia gardła, ucha środkowego czy zatok [16, 22].

6. Podsumowanie

Diagnostyka mikrobiologiczna jest niezbędna w sytuacji podejrzenia paciorkowcowego zapalenia gardła i migdałków podniebiennych. Antybiotykoterapia w ostrym zapaleniu gardła i migdałków powinna być wdrażana tylko wówczas, jeśli badanie mikrobiologiczne potwierdzi etiologię paciorkowcową. W ostrym zapaleniu ucha środkowego i zatok diagnostyka mikrobiologiczna nie jest rutynowo zalecana. Wskazania do podania antybiotyku ustalane są na podstawie objawów klinicznych, danych z wywiadu i przebiegu zakażenia. Powinniśmy wówczas stosować antybiotykoterapię empiryczną zgodną z rekomendacjami. Niestety, bardzo często mamy do czynienia z próbami ustalenia czynnika etiologicznego OZUŚ i OZZP na podstawie badania niewłaściwych materiałów (wymaz z gardła i przedsionka nosa). Często również bakterie hodowane z wymazów z gardła, które są składnikami flory fizjologicznej jamy nosowo-gardłowej lub znajdują się tam jako efekt nosicielstwa, błędnie brane są za czynniki etiologiczne ostrego zapalenia gardła i migdałków. Gronkowiec złocisty rezydujący w przedsionku nosa często uznawany jest za czynnik etiologiczny OZZP. Na podstawie wyników badań nieadekwatnych materiałów lub błędów w interpretacji „znalezisk" w posiewie wymazu z gardła lub przedsionka nosa wdrażana jest antybiotykoterapia „celowana", która w większości tego rodzaju przypadków skutkuje „leczeniem" nosicielstwa nosogardłowego.

Badanie mikrobiologiczne jest rodzajem konsultacji medycznej i nie może być traktowane jako postępowanie oderwane od reszty obrazu chorobowego [15]. Z tego powodu skierowanie na badanie mikrobiologiczne zawsze powinno zawierać niezbędne dane kliniczne chorego, w tym rozpoznanie, aby mikrobiolog mógł ocenić, czy przysłany do badania materiał jest adekwatny dla danego zakażenia. Niewłaściwe dla danego zakażenia materiały nie powinny podlegać badaniu mikrobiologicznemu. Wynik badania mikrobiologicznego nie może być wyliczanką wyhodowanych drobnoustrojów, niezbędnym jego elementem powinna być interpretacja. Tylko takie postępowanie ma szansę ograniczyć niepotrzebne stosowanie antybiotyków w leczeniu zakażeń dróg oddechowych oraz narastanie oporności wśród bakterii zakażających układ oddechowy.

Piśmiennictwo

1. Al-Najjar F.Y.A., Uduman S.A.: Clinical utility of a new rapid test for the detection of group A Streptococcus and discriminate use of antibiotics for bacterial pharyngitis in an outpatient setting. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 308–311 (2008)
2. Baltimore R.S.: Re-evaluation of antibiotic treatment of streptococcal pharyngitis. *Curr. Opin. Pediatr.* **22**, 77–82 (2010)

3. Brahmadathan K.N., Gladstone P.: Microbiological diagnosis of streptococcal pharyngitis: lacunae and their implications. *Ind. J. Medical Microbiol.* **24**, 92–96 (2006)
4. Brook I.: Current management of upper respiratory tract and head and neck infections. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **266**, 315–323 (2009)
5. Chopra H., Snyder J.W.: Laboratory diagnosis of streptococcal pharyngitis. Univ. of Louisville School of Medicine Laboratory Advisor. **2**, 1–6 (2004)
6. Corbeel L.: What is new in otitis media? *Eur. J. Pediatr.* **166**, 511–519 (2007)
7. Erwin A.L., Smith A.L.: Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* **15**, 355–362 (2007)
8. Fontes M.J.F., Bottrel F., Fonseca M.T.M., Lasmar L.B., Diamante R., Camargos P.A.M.: Early diagnosis of streptococcal pharyngotonsillitis: assessment by latex agglutination test. *J. Pediatr.* (*Rio de Janeiro*), **83**, 465–470 (2007)
9. Fretzayas A., Moustaki M., Kitsiou S., Nychtari G, Nicolaidou P.: The clinical pattern of group C streptococcal pharyngitis in children. *J. Infect. Chemother.* **15**, 228–232 (2009)
10. Garau J., Dagan R.: Accurate diagnosis and appropriate treatment of acute bacterial rhinosinusitis: minimizing bacterial resistance. *Clinical Therapeutics.* **25**, 1936–1951 (2003)
11. Garcia-Rodriguez J.A., Martinez M.J.F.: Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *JAC*, **50** (Suppl. S2), 59–73 (2002)
12. Gryczyńska D.: Ostre zapalenie ucha środkowego – diagnostyka i leczenie. *Zakażenia*, **1**, 39–42 (2005)
13. Hadley J.A., Siegert R.: Clinician's manual on rhinosinusitis. Science Press Ltd, London, 2004, s. 1–60
14. Hall M.C., Kieke B., Gonzales R., Belongia E.A.: Spectrum bias of a rapid antigen detection test for group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis in a pediatric population. *Pediatrics*, **114**, 182–186 (2004)
15. Hryniewicz W., Mészáros J.: Zasady racjonalnej chemioterapii przeciwdrobnoustrojowej. (w) Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń, red. W. Hryniewicz, J. Mészáros, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001, s. 21–35.
16. Hryniewicz W., Płusa T. i wsp.: Rekomendacje postępowania w pozaszpitalnych zakażeniach układu oddechowego 2010 (www.antybiotyki.edu.pl)
17. Kadioglu A., Weiser J.N., Paton J.C., Andrew P.W.: The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Rev. Microbiol.* **6**, 288–301 (2008)
18. Kaplan E.L.: Rapid mis-st(r)ep. Pediatrics (2007) (http://www.dynabizvenezuela.com/images/dynabiz/ID3749/siteinfo/Caso%20Cl%C3%ADnico%207.pdf)
19. Kozińska A., Bojarska K., Hryniewicz W.: Nosicielstwo *S. aureus* czy prawdziwe zagrożenie? *Nowa Klinika*, **15**, 553–558 (2008)
20. Lindboek M., Høiby E.A., Lermark G., Steinsholt I.M., Hjortdahl P.: Clinical symptoms and signs in sore throat patients with large colony variant beta-haemolytic streptococci groups C and G versus group A. *British J. General Practice*, **55**, 615–619 (2005)
21. Llor C., Hernández S., Sierra N., Moragas A., Hernández M., Bayona C.: Association between use of rapid antigen detection tests and adherence to antibiotics in suspected streptococcal pharyngitis. *Scand. J. Primary Health Care*, **28**, 12–17 (2010)
22. Marchisio P., Ghisalberti E., Fusi M., Baggi E., Ragazzi M., Dusi E.: Paranasal sinuses and middle ear infections: what do they have in common? *Pediatr. Allergy. Immunol.* **18** (Suppl. 8), 31–34 (2007)
23. Mazur E., Bochyńska E., Kochańska E., Kozioł-Montewka M.: Ocena przydatności parametrów klinicznych oraz badania mikrobiologicznego do optymalizacji antybiotykoterapii ostrego zapalenia gardła i migdałków podniebiennych u dzieci. *Pol. Merk. Lek.* **31**, (181), 31–36 (2011)
24. Mazur E.: Możliwości i ograniczenia diagnostyki mikrobiologicznej ostrych zapaleń górnych dróg oddechowych oraz budowanie podstaw racjonalnej antybiotykoterapii empirycznej na bazie danych lokalnych – opinia mikrobiologa. *Nowa Medycyna*, **2**, 131–137 (2009)
25. Mazur E.: Ostre zapalenie gardła i migdałków podniebiennych – jak diagnozować, jak leczyć? *Nowa Klinika*, **18**, 4051–4056 (2011)
26. Mazur E.: Racjonalna antybiotykoterapia ostrych zapaleń górnych dróg oddechowych. *Pol. Merk. Lek.* **29**, (173), 304–308 (2010)
27. Nascimento-Carvalho C.M.: Outpatient antibiotic therapy as a predisposing factor for bacterial resistance: a rational approach to airway infections. *J. Pediatr.* (*Rio de Janeiro*), **82** (5 Suppl.), S146–S152 (2006)
28. Pettigrew M.W., Gent J.F., Revai K., Patel J.A., Chonmaitree T.: Microbial interactions during upper respiratory tract infections. *Emerging Infect. Diseases*, **14**, 1584–1591 (2008)
29. Ramakrishnan K., Sparks R.A., Berryhill W.: Diagnosis and treatment of otitis media. *Am. Fam. Physician*, **76**, 1650–1658 (2007)
30. Rubin L.G., Kahn R., Vellozzi E., Isenberg H.: False positive detection of group A *Streptococcus* antigen resulting from cross-reacting *Streptococcus intermedius* (*Streptococcus milleri* group). *Pediatric Infect. Disease J.* **15**, 715–717 (1996)
31. Sih T.M., Bricks L.F.: Optimizing the management of the main acute infections in pediatric ORL: tonsillitis, sinusitis, otitis media. *Rev. Bras. Otorinolaringol.* **74**, 755–762 (2008)
32. Steer A., Danchin M.H., Carapetis J.R.: Group A streptococcal infections in children. *J. Paediatrics Child Health*, **43**, 203–213 (2007)
33. Stjernquist-Desatnik A., Orrling A.: Pharyngotonsillitis. *Periodontology 2000*, **49**, 140–150 (2009)
34. Sulikowska A.: Nosicielstwo nosogardłowe wybranych patogenów bakteryjnych: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. *Nowa Medycyna*, **2**, 124–130 (2009)
35. Tanz R.R., Gerber M.A., Kabat W., Rippe J., Seshadri R., Shulman S.T.: Performance of a rapid antigen-detection test and throat culture in community pediatric offices: implications for management of pharyngitis. *Pediatrics*, **123**, 437–444 (2009)
36. Tiemstra J., Miranda R.L.F.: Role of non-group A streptococci in acute pharyngitis. *J. Am. Board Fam. Med.* **22**, 663–669 (2009)
37. Tonnaer E.L.G.M., Graamans K., Sanders E.A.M., Curfs J.H.A.J.: Advances in understanding the pathogenesis of pneumococcal otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 546–552 (2006)
38. van der Veen E.L., Sanders E.A.M., Videler W.J.M., van Staaij B.K., van Benthem P.P.G., Schilder A.G.M.: Optimal site for throat culture: tonsillar surface versus posterior pharyngeal wall. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **263**, 750–753 (2006)
39. Vergison A.: Microbiology of otitis media: a moving target. *Vaccine*, **26S**, G5–G10 (2008)
40. Wasserman E., Taljaard J.: Update on infections caused by *Staphylococcus aureus*. *South. Afr. Epidemiol. Infect.* **26**, 60–64 (2011)
41. Weiser J.N.: The pneumococcus: why a commensal misbehaves? *J. Mol. Med.* **88**, 97–102 (2010)
42. Weiss-Salz I., Yagupsky P.: Asymptomatic carriage of respiratory pathogens: "The wolf shall dwell with the lamb. and a little child shall lead them" (Isaiah 11:6). *Open Infect. Diseases J.* **4**, 11–15 (2010)
43. Wessels M.R.: Streptococcal pharyngitis. *N. Engl. J. Med.* **364**, 648–655 (2011)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 219–225
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNA DIAGNOSTYKA ZAKAŻEŃ IMPLANTÓW STAWU BIODROWEGO

Tekst wykładu przedstawionego na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie w dniach 5–8 września 2012 r.

Dagmara Strzelec-Nowak[1]*, Agnieszka Bogut[1], Justyna Niedźwiadek[1], Maria Kozioł-Montewka[1], Agnieszka Sikora[1]

[1]Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Diagnostyka. 3. Obluzowanie aseptyczne. 4. Obluzowanie septyczne. 5. Subpopulacje SCV. 6. Biofilm bakteryjny. 7. Hodowla bakteriologiczna. 8. Sonikacja. 9. Płyn stawowy. 10. Okołooperacyjna profilaktyka. 11. Podsumowanie

Microbiological diagnostics of prosthetic hip joint infections

Abstract: A prosthetic hip joint loosening – septic or aseptic, is a consequence of a host defence against a foreign body material. Aseptic loosening is connected with small wear debris peeling of from material the implant is composed of. Prosthetic hip joint infection is one of the most serious complications of hip arthroplasty, which is associated with biofilm growing on the implant`s surface and the presence of small colony variants (SCV) of microorganisms. Culture of microorganisms from removed orthopedic implants combined with sonication is simple and useful method to differentiate aseptic type of loosening from bacterial infection. Another simple way is to estimate synovial fluid leukocyte count and percentage of neutrophils. All the mentioned methods, distinguishing two types of implant loosening, are very important in order to administer the appropriate antimicrobial treatment.

1. Introduction. 2. Diagnostics. 3. Aseptic failure. 4. Prosthetic joint infection. 5. SCV subpopulation. 6. Bacterial biofilm. 7. Microbiological culture. 8. Sonication. 9. Synovial fluid. 10. Perioperative prophylaxis. 11. Summary

Słowa kluczowe: obluzowanie aseptyczne, obluzowanie septyczne, płyn stawowy, proteza, sonikacja
Key words: Aseptic failure, Prosthetic joint infection, synovial fluid, prosthesis, sonication

1. Wstęp

Skonstruowanie protezy stawu biodrowego to jeden z najważniejszych etapów w rozwoju chirurgii ortopedycznej. Sztuczny wszczep poprawia jakość życia pacjentów cierpiących z powodu bólu w obrębie stawu pozwalając na normalne funkcjonowanie. Pierwotna wymiana stawu biodrowego uwalnia pacjenta od bólu i niedogodności w dość krótkim czasie. Operacje kolejne, tzw. rewizyjne ze względu na ponowną ingerencję chirurgiczną charakteryzują się znacznie obniżoną efektywnością w stosunku do zabiegów pierwotnych [32]. Mimo wielu istotnych zalet, zabiegi protezoplastyki obarczone są jednak dużym ryzykiem komplikacji. Do niedawna za główną przyczynę braku stabilności protezy uznawano podłoże aseptyczne polegające na złuszczaniu cząsteczek materiałów z których wykonana jest proteza, co prowadzi do osteolizy w obrębie implantu. Coraz częściej mówi się jednak o infekcyjnej przyczynie obluzowania, czyli zakażeniu w obrębie stawu [5, 15].

2. Diagnostyka

Do podstawowych metod diagnostycznych u pacjentów z obluzowaniem protezy stawu biodrowego możemy zaliczyć: diagnostykę obrazową, humoralną i bakteriologiczną. Diagnostyka obrazowa to badania scyntygraficzne pozwalające na ocenę aktywności przemian kostnych we wczesnym okresie obluzowania oraz badania rentgenowskie, pozwalające na rozpoznanie obluzowań późnych. Dodatkowo uzupełnieniem wymienionych jest tomografia komputerowa. Powyższe metody nie dają jednak całkowitej pewności w kwestii różnicowania typu obluzowania protezy. Więcej informacji dostarcza wykonanie USG stawu biodrowego – obrazuje ono płyn stawowy z obecnością krwiaka (we wczesnym okresie po operacji) lub treści ropnej (w późnym okresie po operacji). Badania humoralne pozwalają na ocenę odpowiedzi immunologicznej organizmu, poprzez aktywność przeciwciał oraz innych związków i czynników pojawiających się w odpowiedzi na antygen. Najczęściej stosowaną metodą mikrobiologiczną jest klasyczny posiew na podłożach hodowlanych. Ze względu na trudności w różnicowaniu typu obluzowania nadal trwają badania nad opracowaniem szybkiej, prostej i bezpiecznej metody identyfikacji okołoprotezowej infekcji [24, 41].

3. Obluzowanie aseptyczne

Definicja obluzowania aseptycznego oparta jest na braku objawów klinicznych zakażenia u pacjenta, takich jak przetoka czy naciek zapalny tkanek miękkich oraz na ujemnych wynikach hodowli z zastosowaniem konwencjonalnych metod diagnostyki mikrobiologicznej.

* Autor korespondencyjny: e-mail: dagmara.strzelec@gmail.com

Osteoliza stanowiąca długotrwałą dysfunkcję protezy związana jest z nagromadzeniem w przestrzeni pomiędzy implantem a kością drobin zużycia, które stanowią cel dla komórek układu immunologicznego gospodarza – makrofagów. Makrofagi w odpowiedzi na ciało obce uwalniają liczne mediatory reakcji zapalnej, które stymulują resorpcję kości przy udziale osteoklastów. W wyniku prowadzonej przez makrofagi fagocytozy dochodzi do powstania ziarniniakowej warstwy tkankowej lub błony. Nagromadzenie cząstek powoduje powiększanie się ziarniny z jednoczesnym zanikiem naczyń krwionośnych i powstającymi zmianami martwiczymi. Jeśli ziarnina osiąga rozmiary powodujące rozerwanie torebki stawowej proces zapalny rozprzestrzenia się również poza staw. Mikrocząsteczki materiału z którego wykonana jest proteza mogą mieć wielkość od kilku nanometrów do kilku milimetrów – te neutralizowane są przez fagocytozę przy udziale osteoblastów, fibroblastów lub makrofagów, bądź mniejsze: od 0,05 do 1 μm – te eliminowane są na drodze pinocytozy lub fagocytozy [14, 19, 32]. Najmniejsze cząsteczki są najczęściej rozpuszczalne, charakteryzuje je również możliwe toksyczne działanie na organizm gospodarza. Są one absorbowane w stawie, gromadzone w węzłach chłonnych lub rozprzestrzeniane w organizmie wraz z krwią. np. kobalt, chrom, nikiel, które w konsekwencji mogą prowadzić do groźnych powikłań jak nowotwory, nefropatia, krwotoki [7, 32, 33].

4. Obluzowanie septyczne

Coraz częściej pojawiają się opinie mówiące o tym, że obluzowania typowo aseptyczne zdarzają się rzadko, gdyż ujemne wyniki standardowej hodowli, będące, jak wspomniano wyżej, jednym z podstawowych kryteriów branych pod uwagę w diagnozowaniu obluzowań aseptycznych, wcale nie wykluczają obecności mikroorganizmów na elementach protezy oraz w materiale tkankowym znajdującym się w najbliższym jej sąsiedztwie [15, 21].

Charakterystycznym objawem infekcji okołoprotezowej jest ból w okolicy stawu oraz widoczne w obrazie radiologicznym obluzowanie, któremu nie towarzyszą typowe objawy infekcji.

Źródłem zakażenia implantów stawu biodrowego może być szereg czynników. Po pierwsze zanieczyszczenie tkanek chorego podczas zabiegu chirurgicznego czynnikami egzogennymi. Mimo przestrzegania zasad aseptycznego postępowania oraz działań antybakteryjnej profilaktyki okołooperacyjnej podczas zabiegu mikroorganizmy mogą dostawać się do otwartych ran z flory bytującej okresowo na nożach chirurgicznych, rękawicach, uchwytach lamp operacyjnych. Bardzo często źródłem zakażenia jest powietrze w sali operacyjnej zwłaszcza system klimatyzacyjny, ilość osób na sali, czas trwania zabiegu. Nie bez znaczenia są wykonywane zabiegi dożylnego podawania leków i płynów krwiozastępczych. Do czynników pochodzenia endogennego na pierwszym miejscu należy wskazać występujące u pacjenta przewlekłe zakażenia np. przyzębia, układu moczowego, pokarmowego czy skóry oraz wszelkie zmiany prowadzące do upośledzenia odporności. Zdolność bakterii do bytowania w skórze oraz zasiedlania tkanek głębokich organizmu może być przyczyną rozwoju infekcji w wyniku dostania się patogenów prze mikro- i makrouszkodzenia skóry. Szczególnie groźne jest rozprzestrzenianie się bakterii wraz z chłonką, zwłaszcza z dystalnych części kończyn u pacjentów po zabiegu operacyjnym u których mogło dojść do uszkodzenia przedwęzłowych naczyń chłonnych [34].

„Ciała obce" dla organizmu jak protezy stawowe, są szczególnie podatne na kolonizację bakteryjną, ponieważ są one pozbawione mikrokrążenia, które pełni bardzo ważną rolę w działaniu mechanizmów obronnych układu immunologicznego organizmu gospodarza oraz w dostarczaniu terapeutycznych dawek antybiotyków [37, 42]. Ta zwiększona podatność na zakażenia związane z obecnością protez stawowych związana jest też z tzw. lokalnym defektem granulocytarnym. Aktywacja neutrofilów obserwowana na powierzchni wszczepionych biomateriałów powoduje uwalnianie z ludzkich neutrofilów peptydów, które przyczyniają się do inaktywacji granulocytów. Należy jednak zaznaczyć, że do infekcji może dojść nie tylko podczas zabiegu operacyjnego, ale podczas całego okresu pozostawania implantu w organizmie pacjenta [42].

U pacjentów po zabiegach rewizji implantu stawu biodrowego najczęściej izolowanymi drobnoustrojami są Gram-dodatnie ziarniaki, mianowicie gronkowce koagulazo-ujemne CNS (*coagulase-negative staphylococci*), *Staphylococcus aureus,* paciorkowce oraz enterokoki. Są one czynnikami etiologicznymi ok. 65% zakażeń okołoprotezowych [8, 9, 12]. Szacuje się, że ogółem gronkowce CNS stanowią 30–43% mikroorganizmów związanych z patogenezą infekcji endoprotez, zaś gronkowiec złocisty jest czynnikiem etiologicznym 12–23% tego typu zakażeń [38, 42].

Tlenowe pałeczki Gram-ujemne, takie jak *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa* odpowiedzialne są za ok. 6% zakażeń. Kolejną grupę drobnoustrojów stanowią beztlenowce, włączając bakterie z rodzaju *Propionibacterium*; ich udział w etiologii zakażeń okołoprotezowych sięga 4%. Grzyby odpowiedzialne są za ok. 1% infekcji endoprotez stawu biodrowego i kolanowego. Należy również wspomnieć, że 4–27% zakażeń okołoprotezowych ma charakter mieszany, a w około 7% wyniki hodowli pozostają ujemne, pomimo wystąpienia objawów klinicznych sugerujących infekcyjny charakter dysfunkcji endoprotezy, takich jak treść ropna w obrębie protezy, ostry stan zapalny tkanek znajdujących się

w sąsiedztwie implantu widoczny w obrazie histopatologicznym lub obecność przetoki [4, 8].

Innym typem obluzowania jest typ pozornie aseptyczny – wywołany przez cząsteczki materiału złuszczone z protezy, lecz posiadające na swojej powierzchni LPS bakteryjny. Droga ta nie jest do końca zbadana i poznana, a więc jest trudna do wykrycia [15].

5. Subpopulacje SCV

Trudności diagnostyczne zakażeń okołoprotezowych jako przyczyny obluzowań, wynikają głównie z obecności na powierzchni lub w najbliższym sąsiedztwie implantu drobnoustrojów trudnych do wykrycia i eradykacji, np. w postaci biofilmu, w tym także obecności subpopulacji drobnoustrojów SCV (*small colony variants*). Jest to szczególnie istotne, ponieważ prawidłowe rozróżnienie między zakażeniem a obluzowaniem aseptycznym pozwala na określenie rodzaju dalszego postępowania terapeutycznego. Małe warianty kolonii tzw. SCV są występującymi naturalnie subpopulacjami bakteryjnymi o nietypowych, wyróżniających się cechach wyrażanych fenotypowo, takich jak powolny wzrost, tworzenie bardzo drobnych kolonii, odmiennych morfologicznie od kolonii charakterystycznych dla szczepów o fenotypie dzikim oraz swoiste właściwości biochemiczne, a także znaczną opornością na antybiotyki (aminoglikozydy, sulfametoksazol-trimetoprim). Ta odmienność form SCV jest główną przyczyną problemów w hodowli oraz identyfikacji. Subpopulacje SCV cechują się również nietypową właściwością – mogą bytować wewnątrz komórek gospodarza, takich jak komórki nabłonka, śródbłonka, co zapewnia im ochronę przed działaniem układu immunologicznego gospodarza, a zwłaszcza takich jego składników jak przeciwciała czy elementy układu dopełniacza. SCV mogą powstawać w wyniku spontanicznej selekcji podczas przebiegu zakażenia, są jednak stosunkowo niestabilne i mogą ulegać rewersji do fenotypu „normalnego", charakteryzującego się szybkim wzrostem. Odmienny potencjał patogenny form SCV sprawia, że zakażenie ma zazwyczaj charakter przewlekły, latentny lub nawracający. Szczególną cechą charakteryzującą SCV jest auksotrofia wobec takich związków jak hemina, metadion, tiamina, tymidyna. W konsekwencji powoduje to zaburzenie oksydacyjnej fosforylacji oraz powstanie ATP w wyniku zakłócenia transportu elektronów [22, 29–31].

6. Biofilm bakteryjny

Bakterie rosnące w postaci biofilmu chronione są przed działaniem leków antybakteryjnych oraz mechanizmami odpornościowymi układu immunologicznego organizmu gospodarza. Wynika to między innymi ze spowolnienia tempa wzrostu mikroorganizmów, które przechodząc w tzw. stacjonarną fazę wzrostu wskutek niewystarczającej penetracji substratów metabolicznych, takich jak glukoza czy tlen prowadzą do nagromadzenia końcowych produktów przemiany materii. Bakterie tworzące biofilm osadzone są na polimerowej macierzy o ujemnym ładunku, która ogranicza dyfuzję dużych cząsteczek, takich jak leki przeciwbakteryjne, enzymy, czy składniki dopełniacza. Ponadto niektóre subpopulacje bakterii mogą różnicować się do form zbliżonych do bakteryjnych spor, co powoduje wzrost oporności na antybiotyki. Wspomniane cechy bakterii w biofilmie, zwłaszcza oporność na antybiotyki powoduje zmniejszoną penetrację leków do wnętrza komórek, dzięki czemu stosowanie terapii antybiotykami nie zawsze przynosi terapeutyczne wyniki jakie obserwuje się przy zwalczaniu drobnoustrojów nie tworzących biofilmu.

Żywotność sztucznych stawów, w tym protez stawów biodrowych zależy od tak zwanego zjawiska – *race for the surface*, czyli zależności między tempem adhezji i wzrostem drobnoustrojów w postaci biofilmu a integracją tkankową implantu. Tuż po implantacji powierzchnia protezy zostaje pokryta warstwą białek surowicy krwi oraz płytek krwi. Albumina – główny białkowy składnik surowicy – ulega szybkiemu zdeponowaniu na powierzchni implantu, zapobiegając niespecyficznej aktywacji neutrofilów i osadzaniu się białek macierzy zewnątrzkomórkowej na biomateriale [1, 16, 40]. Warto wspomnieć, że gronkowce, które są najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń okołoprotezowych, wytwarzają adhezyny MSCRAMMs, które wykazują zdolność wiązania białek macierzy pozakomórkowej, takich jak fibronektyna, fibrynogen, fibryna, kolagen, laminina, witronektyna, trombospondyna, elastyna, sialoproteina kości. W wyniku interakcji wspomnianych białek z komórkami bakterii ulegają one adhezji do powierzchni implantu [25, 40]. Nawiązując do wspomnianego „wyścigu o powierzchnię" można stwierdzić, że bakteryjna kolonizacja powierzchni zostaje zatrzymana wówczas, gdy komórki gospodarza – makrofagi i fibroblasty „okażą się silniejsze" i szybciej zadziałają. Jeśli natomiast mechanizmy obronne okażą się wolniejsze od tempa bakteryjnej adhezji powierzchnia implantu zostanie bardzo szybko pokryta biofilmem. Zaburzenie swoistej homeostazy między układem immunologicznym a adhezją bakterii prowadzi do osteolizy i zaburzeń w zrastaniu się kości [1, 35]. Mechanizmy wirulencji bakterii m.in. toksyny uniemożliwiając prawidłowe funkcjonowanie komórek odpowiedzialne są za brak integracji implantu i naturalnych elementów stawu doprowadzając w konsekwencji do obluzowania wszczepu. Ponieważ „przyjmowanie się" protezy jest procesem długotrwałym, stąd jeśli komórki bakteryjne

dostaną się do organizmu pacjenta podczas zabiegu operacyjnego zwiększa się prawdopodobieństwo powstania biofilmu. W konsekwencji mikroorganizmy mają dużą szansę przeżycia w obrębie biofilmu, nawet jeśli ulegają ekspozycji na leki przeciwbakteryjne. Prowadzi to do rozwoju przewlekłej reakcji zapalnej [16].

7. Hodowla bakteriologiczna

Podstawową metodą kwalifikacji typu obluzowania są wyniki hodowli mikrobiologicznej materiałów pobranych od pacjenta. Materiałami mogą być: płyn stawowy, ziarnina, wymieniane elementy protezy (przy operacjach rewizyjnych), ale też mięśnie i tkanki otaczające implant. Ze względu na różnorodność mikroorganizmów hodowla prowadzona jest na różnych podłożach i w różnych warunkach hodowlanych. Najczęściej wykorzystuje się podłoża takie jak: podłoże Chapmana, podłoże MacConkey, podłoże Sabouraoud, podłoże Casmana, podłoże BHI.

W celu hodowli powinno pobierać się przynajmniej trzy fragmenty tkanek i, o ile to możliwe, należy zaprzestać antybiotykoterapii na co najmniej dwa tygodnie przed planowanym zabiegiem [3, 37]. Inne źródła rekomendują pobranie 5 lub 6 próbek tkanek co pozwala osiągnąć wymaganą czułość i specyficzność hodowli [2] biorąc pod uwagę niewielką liczbę komórek drobnoustrojów w tego typu materiałach. Zalecana jest również przedłużona (trwająca do 14 dni) hodowla materiałów klinicznych, w celu zwiększenia detekcji czynników etiologicznych infekcji okołoprotezowych [28]. Drobnoustroje jak gronkowce, paciorkowce, enterokoki, czy *Enterobacteriacae*, charakteryzują się wzrostem na podłożach hodowlanych w ciągu pierwszego tygodnia inkubacji, ale drobnoustroje takie jak *Propionibacterium acnes* wymagają dłuższego czasu hodowli i ich wzrost uzyskiwany jest z reguły w ciągu drugiego tygodnia inkubacji materiałów tkankowych. Materiały tkankowe powinny być inkubowane warunkach tlenowych i beztlenowych; hodowle w kierunku grzybów i mykobakterii nie muszą być stosowane rutynowo; powinny być raczej zarezerwowane dla sytuacji szczególnych. Izolacja wirulentnego drobnoustroju, takiego jak gronkowiec złocisty, może świadczyć o aktywnym procesie infekcyjnym [26].

Metoda hodowli materiałów na tradycyjnych podłożach mikrobiologicznych nie zawsze daje wyniki pozytywne co związane jest ze wspomnianym już biofilmem. Bakterie w takiej postaci są trudniejsze do izolacji, ze względu na formułowaną przez nie „swoistą", niemal nierozerwalną niszę [9, 41].

Stąd jedną ze skutecznych metod coraz częściej stosowaną do rozbijania biofilmu i izolacji pojedynczych komórek bakteryjnych jest działanie ultradźwiękami w procesie zwanym sonikacją [13, 17, 36].

8. Sonikacja

Sonikacja polega na działaniu ultradźwięków w kąpieli wodnej na elementy protezy usunięte podczas zabiegu rewizji, umieszczone w jałowych pojemnikach. Proces wzbogacony jest o kilkukrotny etap worteksowania zwiększającego ilość pęcherzyków powietrza wzmacniających zjawisko kawitacji czyli pozwalającego na odrywanie fragmentów biofilmu z powierzchni. Płyn sonikacyjny może być wykorzystany do założenia hodowli bakteryjnej oraz analiz molekularnych [13, 17, 23, 36].

Metoda sonikacji połączona z hodowlą uzyskanego w tym procesie płynu, jest jedną z metod zalecanych w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych, ze względu na wysoką czułość w porównaniu z tradycyjną hodowlą materiałów tkankowych pobieranych śródoperacyjnie. Mimo wielu zalet tej metody, pewnym ograniczeniem jest wrażliwość niektórych żywych bakterii na ultradźwięki. Wynika to ze stresu jakiemu poddawane są *in vivo* podczas usuwania i transportu protezy do laboratorium, w porównaniu do szczepów typowo laboratoryjnych pozbawionych wrażliwości na ultradźwięki. Być może wynika to także z silnej adaptacji „biofilmowych" bakterii do warunków panujących w tym specyficznym „ekosystemie", tak że zastosowanie podłóż odżywczych i procedur diagnostycznych mających na celu ich izolację, może nie zapewniać warunków wystarczających dla wzrostu w warunkach *in vitro*. Ponadto, rozcieńczenie ważnych bakteryjnych molekuł sygnałowych, takich jak laktonów N-acyl homoserynowych w przypadku bakterii Gram-ujemnych oraz feromonów peptydowych w przypadku bakterii Gram-dodatnich, których krytyczne stężenia są kluczowe dla bakteryjnego wzrostu, może stanowić o trudnościach napotykanych przy próbach ich izolacji z materiałów klinicznych. Bakterie rosnące przez długi czas w postaci biofilmu – chronione przed działaniem układu immunologicznego organizmu gospodarza, mogą wykazywać zmniejszone zdolności adaptacyjne do nowych warunków zewnętrznych [18, 39].

Hodowla materiałów tkankowych oraz płynu stawowego pobieranych śródoperacyjnie stosowane samodzielnie charakteryzują się niewielką czułością. Uzupełnienie zatem tych metod etapem wstępnej sonikacji stanowi cały proces diagnostyczny dokładniejszym i skuteczniejszym, pozwalając na wykrycie drobnoustrojów związanych zarówno z powierzchnią implantu jak i bytujących w jego sąsiedztwie [23, 36, 37, 38].

9. Płyn stawowy

Bardzo ważnym materiałem diagnostycznym jest płyn stawowy. Mimo iż badanie płynu wykonuje się głównie w przebiegu chorób reumatycznych jak reumatoidalne zapalenie stawów, jego analiza mikroskopowa

pozwala w prosty i szybki sposób zróżnicować typ septyczny obluzowania od aseptycznego.

Płyn, określany jako „płynna tkanka łączna" stanowi środowisko stawu, dostarczając substancji odżywczych dla chrząstki stawowej a także nadając jej śliskość oraz pełni funkcje amortyzujące pracę stawu. Jest to mieszanina składników osocza – elektrolitów, cukru, kwasu moczowego, białek i kwasu hialuronowego oraz związków wytwarzanych w stawie. Komórkami jakie można znaleźć w płynie są głównie monocyty (30–70%), limfocyty (25–30%), granulocyty obojętnochłonne (6–25%), a także makrofagi, komórki LE, synowiocyty, plazmocyty, fibroblasty, oraz liczne kryształy np. moczanu sodowego, pirofosforanu wapniowego, apatyty, szczawiany wapniowe, krople cholesterolu, lipidy .

Płyn fizjologiczny ma barwę słomkową lub żółtą, jest przejrzysty, uszkodzenie naczyń krwionośnych podczas pobierania lub uraz z krwawieniem do jamy stawowej powoduje krwistoczerwone zabarwienie płynu. Zabarwienie mleczne świadczy o nagromadzeniu się lipidów lub kryształów, natomiast o infekcji bakteryjnej – zabarwienie zielonkawe, lub szare. Możemy wyróżnić 3 typy płynu stawowego:

– niezapalny,
– zapalny,
– septyczny.

Płyn stawowy pobierany jest poprzez nakłucie stawu lub śródoperacyjnie podczas zabiegu chirurgicznego do jałowych probówek – z antykoagulantem EDTA oraz bez antykoagulantu. Analiza powinna być wykonana jak najszybciej, najlepiej do 4 h od pobrania, ze względu na spadek ilości neutrofili – po 24 h przechowywania aktywność spada o 31%, po 72 h już o 78%. Płyn bez antykoagulantu przeznaczony jest do badań bakteriologicznych na tradycyjnych podłożach hodowlanych, natomiast z EDTA do badań mikroskopowych, tj. oznaczenie liczby leukocytów wraz z wykonaniem rozmazu barwionego metoda May-Grunwald-Giemsa i określeniem % składu komórek, zwłaszcza granulocytów obojętnochłonnych oraz wykonania preparatów: bezpośredniego i barwionego metodą Grama [10, 43].

Oznaczanie liczby leukocytów oraz procentowego udziału neutrofilów w płynie stawowym jest wstępną, szybką, prostą i dokładną metodą ułatwiającą różnicowanie obluzowań aseptycznych i zakażeń okołoprotezowych. Granulocyty obojętnochłonne stanowią pierwsza linię obrony organizmu w przypadku infekcji bakteryjnej, i to właśnie one jako pierwsze pojawiają się w miejscu toczącego się procesu zapalnego. W literaturze można spotkać różne wartości progowe wskazujące na proces infekcyjny, najczęściej pojawiającą się wartością cut off jest 1700 leukocytów/µl płynu stawowego i 65% neutrofilów, co charakteryzuje się czułością rzędu odpowiednio 94% i 97% oraz specyficznością rzędu 88% i 98% [10, 37, 41, 44].

10. Okołooperacyjna profilaktyka

Zabiegi ortopedyczne obok zabiegów chirurgicznych w obrębie jamy brzusznej obarczone są największą liczbą okołooperacyjnych zakażeń [20]. Trudności w leczeniu okołoprotezowych infekcji stawu biodrowego związane są nie tylko z formowaniem się biofilmu ale przede wszystkim opornością bakterii na stosowane antybiotyki. Okołooperacyjna profilaktyka antybiotykowa powinna zostać wstrzymana do momentu pobrania materiałów tkankowych do hodowli – ekspozycja na antybiotyki może prowadzić bowiem do fałszywie ujemnych wyników [3, 35, 37]. W szpitalach praktykowane jest podawanie pacjentowi antybiotyków 24-godziny przed reoperacją, w wielu przypadkach nie zapewnia to jednak eliminacji bakterii [35]. Rozważając odpowiedni schemat leczenia antybiotykami należy brać pod uwagę takie właściwości jak stopień penetracji antybiotyku, spektrum jego działania, czy skuteczność. Stąd podczas zabiegów rewizyjnych polecane jest stosowanie w miejscu operowanym gąbki kolagenowej zawierającej 200 mg siarczanu gentamycyny, o właściwościach bakteriobójczych wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Gentamycyna należąca do naturalnych antybiotyków produkowana jest przez *Micromonospora purpurea*. Wykazuje działanie hamujące biosyntezę białek bakteryjnych, zwłaszcza u takich bakterii jak pałeczki Gram-ujemne, gronkowce oraz prątki gruźlicy [6, 11, 27].

Podanie miejscowe gąbki pozwala na uzyskanie wyższych stężeń gentamycyny w tkance kostnej, płynie stawowym i otaczających tkankach niż droga doustna. Jest to szczególnie ważne w przypadku tych drobnoustrojów, które charakteryzują się wyższym wskaźnikiem MIC a które to najczęściej odpowiadają za okołoprotezowe infekcje. Efekt działania gąbki widoczny jest już po kilku godzinach i utrzymuje się przez kilka dni po zabiegu. Stężenie gentamycyny jest wysokie, lecz nie wywołuje efektu toksycznego, jest więc wolne od działań niepożądanych. Istotną cechą jest samoistne wchłanianie się kolagenowej gąbki oraz zawartej w niej gentamycyny w sposób parenteralny gdyż antybiotyk ten nie ulega wchłanianiu po podaniu doustnym [20, 27].

11. Podsumowanie

Obluzowanie implantów stawów biodrowych to główne następstwo zabiegów protezoplastyki. W zależności od przyczyny może ono przebiegać na drodze septycznej bądź aseptycznej. Formowanie biofilmu na powierzchni wszczepu oraz obecność trudno wykrywalnych małych wariantów kolonii SCV to podstawowe przyczyny septycznej drogi obluzowania. Naturalne złuszczanie się cząstek materiału z którego wykonana jest proteza wskutek codziennego „użytkowania" prowadzi

do osteolizy a ta do obluzowania aseptycznego implantu. Bardzo istotne z punktu wdrożenia odpowiedniego leczenia jest rozróżnienie typu obluzowania, stąd w ostatnich latach prowadzone są poszukiwania prostych i szybkich testów diagnostycznych. Jednym z unowocześnień jest poddawanie pobranych od pacjenta materiałów procesowi sonikacji tak aby rozbić ewentualny biofilm i zwiększyć prawdopodobieństwo dodatniej hodowli, która w stosunku do materiałów nie poddanych temu procesowi nie zawsze pozwala na wykrycie obecności drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

1. Arciola C.R.: Still stuck in the slime. *Int. J. Artif. Organs.* **31**, 749–751 (2008)
2. Atkins B.L., Athanasou N., Deeks J.J.: Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2932–2939 (1998)
3. Bauer T.W., Parvizi J., Kobayashi N., Krebs V.: Current Concepts Review. Diagnosis of periprosthetic infection. *J. Bone Joint Surg.* **88-A**, 869–882 (2006)
4. Berbari E.F., Marculescu C., Sia I., Lahr B.D., Hanssen A.D., Steckelberg J.M., Gullerud R., Osmon D.R.: Culture-negative prosthetic-joint infection. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1113–1119 (2007)
5. Blacha J.: Wpływ procesów obluzowania sztucznych stawów biodrowych i operacji rewizyjnych na miejscowy i systemowy poziom wybranych cytokin i wskaźników wzrostu. Rozprawa habilitacyjna, Katedra i Klinika Ortopedii i Traumatologii, Uniwersytet Medyczny Lublin 2008
6. Bratzle D.W.,Hunt D.R.: The surgical infection prevention and surgical care improvement Project:national initiatives to improve outcomes for patients having surgery. *Clin. Infect. Dis.* **3**, 322–330 (2006)
7. Chen F.S., Scher D.M., Clancy R.M., Vera-Yu A., Di Cesare P.E.: In vitro and *in vivo* activation of polymorphonuclear leukocytes in response to particulate derbis. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 904–912 (1999)
8. Cobo J., Del Pozo J.L.D.: Prosthetic joint infection: diagnosis and management. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **9**, 787–802 (2011)
9. Del Pozo J.L., Patel R.: Infection associated with prosthetic joints. *N. Engl. J. Med.* **361**, 787–794 (2009)
10. Dougados M.: Synovial fluid cell analysis. *Bailliere's Clin. Rheumatol.* **10**, 519–534 (1996)
11. Dzierżanowska D.: Antybiotykoterapia praktyczna. Alfa-medica press, Bielsko Biała 2008
12. Esposito S., Leone S.: Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **32**, 287–293 (2008)
13. Esteban J., Gomez-Barrena E., Cordero J., Martín-de-Hijas N.Z., Kinnari T.J., Fernandez-Roblas R.: Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 488–492 (2008)
14. Hallab N.J., Jacob J.J.: Biologic effects of implant *Derbis. Bull. NYU Hosp. Jt. Dis*. **67**, 182–188 (2009)
15. Hoenders C.C.S.M., Harmsen M.C., van Luyn M.J.: The local inflammatory environment and microorganisms in "aseptic" loosening of hip prostheses. *J. Biomed. Mater Res.* Part B: *Appl. Biomater*, **86**, 291–301 (2008)
16. Hogdall D., Hvolris J.J., Christensen L.: Improved detection methods for infected hip joint prostheses. *APMIS*, **118**, 815–823 (2010)
17. Holinka J., Bauer L., Hirschl A.M., Granninger W., Windhager R., Presterl E.: Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J. Orthopaedic Res. Apr.* **29**, 617–622 (2011)
18. Ince A., Rupp J., Frommelt L., Katzer A., Gille J., Löhr J.F.: Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after Total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection? *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1599–1603 (2004)
19. Ingham E., Fisher J.: The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials*, **26**, 1271–1286 (2005)
20. Jaworska-Gromaszek I.,Kozioł-Montewka M., Niedźwiadek J., Ligięza J., Rudzki S., Mazurkiewicz T.: Skuteczność gąbki kolagenowej zawierającej 200 mg siarczanu gentamycyny w profilaktyce i leczeniu zakażeń miejsca operowanego. *Sepsis*, **3**, 93–96 (2010)
21. Marczyński W., Białecki J., Rąpała K., Lachowicz W., Warzocha A.: Przyczyny septycznego obluzowania protez stawów biodrowych. *Sepsis*, **3**,105–108 (2009)
22. Melter O., Radojevič B.: Small colony variants of *Staphylococcus aureus* – review. *Folia Microbiol.* **55**, 548–558 (2010)
23. Monsen T., Lovgren E., Widerstrom M., Wallinder L.: In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2496–2501 (2009)
24. Niedźwiadek J., Kozioł-Montewka M., Strzelec-Nowak D., Bogut A., Blacha J., Mazurkiewicz T., Marczyński W., Rak J., Macias J.: Mikrobiologiczne i immunologiczne przyczyny septycznego i aseptycznego obluzowania implantów stawu biodrowego. *Sepsis*, **4**,197–203 (2011)
25. O'Gara J.P.: *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**,179–188 (2007)
26. Parvizi J., Segreti J. et al. : New definition for periprosthetic joint infection. *J. Arthroplasty*, **26**, 1136–1138 (2011)
27. Patzlaff M.M.: Clinical appraisal of collagen-gentamicin implant. P.S.S.T November, 1–70 (2001)
28. Schäfer P., Fink B., Sandow D., Margull A., Berger I., Frommelt L.: Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 1403–1409 (2008)
29. Sendi P., Frei R., Maurer T.B., Trampuz A., Zimmerli W., Graber P.: *Escherichia coli* variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1720–1725 (2010)
30. Sendi P., Proctor R.A.: *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* **17**, 54–58 (2008)
31. Sendi P., Rohrbach M., Graber P., Frei R., Ochsner P., Zimmerli W.: *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 961–967 (2006)
32. Słomiński J.: Aseptyczne obluzowanie panewki protezy stawu biodrowego. Rozprawa habilitacyjna, Klinika Ortopedii, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa 2006
33. Szarek A.: Ocena zużycia metalowych głów endoprotez stawu biodrowego usuniętych z organizmu ludzkiego z powodu aseptycznego obluzowania. *Inż. Biomater*, **11**, 6–10 (2008)
34. Szczęsny G., Babiak I., Kowalewski M., Górecki A.: Septyczne obluzowania protez stawów biodrowego i kolanowego. *Chir. Narządów Ruchu Ortop. Pol.* **70**, 179–184 (2005)

35. Trafny E.A.: Rola bakterii w zakażeniach w ortopedii. *Sepsis*, **2**, 123–127 (2009)
36. Trampuz A, Patel R. i wsp.: Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N. Eng. J. Med.* **357**, 654–663 (2007)
37. Trampuz A., Widmer A.F.: Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opinion Infect. Dis.* **19**, 349–356 (2006)
38. Trampuz A., Zimmerli W.: Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med. Wkly.* **135**, 243–251 (2005)
39. Tunney M.M., Patrick S., Curran M.D., Ramage G., Hanna D., Nixon J.R., Gorman S.P., Davis R.I., Anderson N.: Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3281–3290 (1999)
40. Widmer A.: New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin. Infect. Dis.* **33** (Suppl. 2), S94–106 (2001)
41. Zimmerli W.: Prosthetic-joint-associated infections. *Best Practice & Research Clinical Rheumatolgy*, **20**, 1045–1063 (2006)
42. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P.E.: Prosthetic joint infections. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1645–1654 (2004)
43. Zimmermann-Górska I., Białkowska-Puszczewicz G., Puszczewicz M.: Badanie płynu stawowego, Skrypt dla studentów analityki medycznej. Poznań 1997
44. Zmistowski B., Restrepo C., Huang R., Hozack W.J., Parvizi J.: Periprosthetic joint infection diagnosis:A complete understanding of white blood cell count and differential. *J. Arthroplasty Apr.* **27** (2012)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 3, 227–235
http://www.pm.microbiology.pl

ZAKAŻENIA MIEJSCA OPEROWANEGO – CHARAKTERYSTYKA CZYNNIKÓW RYZYKA, ENDOGENNYCH ŹRÓDEŁ ZAKAŻENIA I METODY ZAPOBIEGANIA

Tekst wykładu przedstawionego na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie w dniach 5–8 września 2012 r.

Maciej Montewka[1], Aneta Skrzek[2], Dorota Plewik[3], Sławomir Rudzki[1], Andrzej Wysokiński[2], Maria Kozioł-Montewka[3]*

[1]Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
[2]Katedra i Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
[3]Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Czynniki ryzyka zakażeń. 3. Najczęstsze patogeny w zakażeniach chirurgicznych. 4. Zakażenia miejsca operowanego po operacjach kardiochirurgicznych. 5. Zakażenia u pacjentów po wszczepieniu stymulatora oraz kardiowertera defibrylatora. 6. Metody zapobiegania ZMO. 7. Podsumowanie

Surgical site infections-characterization of risk factors, endogenous sources of infection and methods of prevention

Abstract: Surgical site infection (SSI) is the most common and potentially preventable postoperative complication. It is one of the most frequent nosocomial complications representing about a fifth of all healthcare associated infections. It has significant influence in terms of mortality, morbidity, readmission rate, cost and the length of stay in hospital. The following three factors are the determinants of any infectious process: 1. The infecting organism, 2. The environment in which the infection takes place (the local response), 3. The host defense mechanism, which deals systematically with the infectious process.

Taking into account the incidence of surgical site infections and resulting serious health problems the risk of infection needs to by assessed. The risk of infection is associated with the clinical and environmental conditions, and above all with the source of infection. As shown, a frequent source of infection is the normal flora of the patient i.e. Intestinal bacteria in the case of operations on the abdomen and skin flora in the case of cardiac surgery. Measures to reduce the risk of infection include the shortening of the endogenous flora of the patient stay in hospital, prophylactic eradication of MRSA from nasal mucosa of the atria, better personal hygiene before surgery, adequate perioperative prophylaxis and proper care of wounds.

1. Introduction. 2. Risk factors of infection. 3. The most common pathogens in surgical site infection (SSI). 4. SSI after cardiac surgery. 5. Infections in patients after implantation of permanent pacemaker and cardioverter defibrillator. 6. Methods of preventing SSI. 7. Summary

Słowa kluczowe: metody zapobiegania, zakażenie miejsca operowanego (ZMO), źródło infekcji
Key words: methods of prevention, source of infection, surgical site infection (SSI)

1. Wstęp

Zakażenie miejsca operowanego (ZMO) pomimo, że jest to komplikacja potencjalnie możliwa do uniknięcia, w oddziałach zabiegowych stanowi najczęstszą liczbę powikłań pooperacyjnych. W zależności od rodzaju operacji, stopnia czystości rany jak i pola operacyjnego zakażenia występują w zróżnicowanym stopniu. Mając na uwadze skutki zdrowotne pacjentów jak i koszty leczenia powikłań, na całym świecie prowadzone są badania, analizy przyczyn zakażenia, rodzaju bakterii i źródeł zakażenia, czynników ryzyka zakażenia oraz poszukiwania metod które pozwoliłyby na zmniejszenie liczby zakażeń [19, 28].

Najpoważniejsze skutki są obserwowane u pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej terapii, oddziałach chirurgicznych przy operacjach w zakresie jamy brzusznej lub operacjach kardiochirurgicznych. Inny rodzaj powikłań w postaci zakażeń dotyczy zakażeń implantów w tym endoprotez jak endoprotezy stawu biodrowego oraz zakażenia u pacjentów po wszczepieniu stymulatora lub kardiowertera defibrylatora.

ZMO – należy do grupy zakażeń szpitalnych – jest zakażeniem pojawiającym sie w ciągu 30 dni od operacji w przypadku gdy nie były użyte materiały sztuczne/protezy, oraz do 1 roku w przypadku ich użycia. Szacuje się, że w ok. 2–7% wszystkich operacji rozwija sie ZMO.

ZMO można podzielić ze względu na miejsce występowania:

1. zakażenia powierzchowne (skóra i tkanka podskórna),
2. zakażenia głębokie (powięź i mięśnie),
3. zakażenia narządu lub jamy ciała w bezpośrednim kontakcie z miejscem operowanym [15].

Zakażenia te powodują znaczący wzrost kosztów hospitalizacji pacjentów oraz zwiększają odsetek

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie; ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. 81 742 37 85; e-mail: mikrobiologia.lublin@wp.pl

śmiertelności i przedłużają pobyt chorych w szpitalu. Świadomość zagrożenia oraz trafna modyfikacja czynników pełni istotną rolę w zmniejszaniu ilości ZMO. Badania mikrobiologiczne dostarczają istotnych informacji co do gatunku drobnoustroju, wrażliwości na antybiotyki i prawdopodobnego źródła pochodzenia tych drobnoustrojów. Mogą to być zakażenia egzogenne, drobnoustrojami pochodzącymi ze środowiska szpitalnego, nabywane podczas przedoperacyjnego pobytu pacjenta w szpitalu w wyniku kolonizacji przez szczepy szpitalne, zakażenia nabyte podczas operacji pochodzące ze środowiska sali operacyjnej lub zakażenie rany po operacji. Celem uniknięcia tego typu zakażeń wprowadza się liczne procedury prowadzące do czystości mikrobiologicznej oddziałów zabiegowych i sal operacyjnych. Na podstawie analizy drobnoustrojów zakażających miejsce operowane wyłania się istotny problem wskazujący, że większa część zakażeń jest wywołana drobnoustrojami stanowiącymi florę pacjenta – co określa się jako zakażenia endogenne. W operacjach na jamie brzusznej z przecięciem przewodu pokarmowego są to najczęściej drobnoustroje flory jelitowej przyporządkowane danemu odcinkowi przewodu pokarmowego [16]. Znajomość cech tych drobnoustrojów ma istotne znaczenie podczas ustalania profilaktyki okołooperacyjnej jak i terapii empirycznej podczas zakażenia [8]. Większość drobnoustrojów flory jelitowej cechuje wysoka oporność na antybiotyki a często jest to oporność na wiele antybiotyków. Innym źródłem zakażeń endogennych jest flora skóry pacjenta, są to najczęściej gronkowce koagulazo-ujemne (CNS) w tym *Staphylococcus epidermidis*. Ważną cechą tych drobnoustrojów jest wysoki odsetek izolatów metycylinoopornych (MRCNS) co skutkuje opornością na antybiotyki beta-laktamowe – w tym penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy czy karbapenemy. Zakażenia tymi drobnoustrojami stanowią problem w operacjach związanych ze wszczepieniem endoprotez stawów, powikłaniach po operacjach kardiochirurgicznych szczególne jako zakażenia rany mostka oraz po wszczepieniu stymulatora lub kardiowertera defibrylatora [15].

2. Czynniki ryzyka zakażeń

Czynniki ryzyka mające wpływ na ZMO można podzielić na trzy grupy: zależne od pacjenta (np. odporność), rodzaj mikroorganizmu powodującego infekcję oraz czynniki określające pole operacyjne. Przygotowanie pacjenta do zabiegu np.: kąpiel z użyciem odpowiednich roztworów (chlorheksydyna), właściwy sposób usunięcia owłosienia z pola operacyjnego czy usunięcie potencjalnych mikroorganizmów mogących spowodować zakażenie rany. Określono także wiele innych czynników mających wpływ na ZMO, które wpisują się w codzienną rutynę chirurgiczną, np.: dokładne mycie rąk i używanie płynu dezynfekcyjnego, stosowanie odpowiednich maseczek i rękawiczek w trakcie zabiegu. Czynniki środowiskowe mające znaczący wpływ na efekt końcowy leczenia np. dodatnie ciśnienie w sali operacyjnej w stosunku do pomieszczeń otaczających trakt, użycie odpowiednich filtrów powietrza a także wymiana powietrza na świeże co odpowiednią ilość cykli wentylacji. Istotnym czynnikiem jest ponad to dobra technika chirurgiczna, nie pozostawianie martwych przestrzeni, zabezpieczanie tkanek przed wytworzeniem się krwiaków oraz atraumatyczny dla tkanek sposób operowania. Ostatecznie prawidłowe postępowanie z raną pooperacyjną a także doinformowanie pacjenta na temat jej właściwej pielęgnacji mają ogromny wpływ na jej gojenie [1, 15].

Współcześnie zakres i rodzaje zakażeń chirurgicznych uległy znacznemu rozszerzeniu z powodu operowania coraz większej liczby chorych w podeszłym wieku i obciążonych wieloma chorobami towarzyszącymi.

Współczesna chirurgia charakteryzuje się wzrastającą liczbą ciężkich zakażeń z powodu wielu czynników takich jak:

1. Wykonywanie coraz bardziej złożonych operacji u osób w starszym wieku, obciążonych wieloma chorobami towarzyszącymi (ASA grupa III, IV a nawet V) [31],
2. Rozwój transplantologii, nieuchronnie związanej ze stosowaniem immunosupresji,
3. Stosowanie różnego rodzaju implantów (siatki, protezy itd.),
4. Operowanie chorych z obniżoną odpornością,
5. Stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum co powoduje narastanie oporności.

Powstawanie coraz to węższych specjalności jest przyczyną zwiększonego ruchu pomiędzy oddziałami i szpitalami, co sprzyja rozwojowi zakażeń.

Współczesny chirurg musi znać czynniki ryzyka rozwoju zakażenia, musi umieć przewidzieć rozwój zakażenia i skutecznie jemu zapobiegać i leczyć oraz znać zasady postępowania aseptycznego, antyseptycznego, zasady właściwej profilaktyki antybiotykowej i antybiotykoterapii [1].

Niewydolność krążenia, niewydolność oddechowa, ciężki uraz chirurgiczny, obniżenie temperatury ciała chorego, hipowolemia, nadmiar katecholamin i wazopresyny nasilają stopień niedotlenienia tkankowego. Hipoksja tlenowa zwiększa ryzyko zakażenia tkanek [15].

Usprawnienie krążenia, zwiększenie ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach, leczenie żywieniowe i antybiotyki są jednakowo ważne dla immunokompetencji chorego i zwalczania zagrażającego zakażenia. Spadek ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach obniża aktywność leukocytów i makrofagów, sprzyjając rozwojowi zakażenia. Bakteriobójcze działanie neurofilów opiera

się na procesach oksydatywnych powstawania nadtlenków z tlenu. Reakcja ta jest katalizowana przez oksygenazę NADPH-zależną, zależną od $p0_2$ w tkankach. Jeśli $p0_2$ w tkance obniży się poniżej 30 mm Hg, spada aktywność neurofilów i rozwija się zakażenie.

Okołooperacyjne podawanie do oddychania mieszanek gazowych z 80% zawartością tlenu redukuje o 50% częstość zakażeń miejsca operowanego z 11,2% do 5,2% [1].

Zostały opracowane indeksy ryzyka występowania ZMO. Do najbardziej znanych zalicza się: indeks SENIC i NNIS. Według Indeksu SENIC (Study of the Efficacy of Nosocomial Infection Control) do najważniejszych czynników ryzyka ZMO należą:

1. Operacje brzuszne,
2. Czas trwania operacji powyżej 2 godzin,
3. Pole operacyjne skażone lub brudne,
4. Więcej niż 3 składowe w końcowym rozpoznaniu.

Przy braku jakiegokolwiek z czynników ryzyka częstość ZMO ocenia się na 1% przy stwierdzeniu 1 czynnika – częstość ZMO wynosi 3,6%, przy 2 czynnikach – ZMO w 8,9% przypadków, przy 3 czynnikach – ZMO w 17,2%, a przy 4 czynnikach zakażenie obserwuje się w 27% przypadków [9].

Natomiast indeks NNISS (National Nosocomial Infection Surveillance System) zawiera trzy nieco inne główne czynniki ryzyka:

1. Operacja w polu skażonym lub brudnym,
2. Czas operacji powyżej 2 godz. lub powyżej 75% czasu przewidzianego dla danej operacji,
3. Stan ogólny chorego oceniony wg skali ASA na powyżej 3 punktów.

Przy braku któregokolwiek z wymienionych czynników ryzyko częstości ZMO wynosi 1,5%, przy obecności 1 czynnika – ZMO w 2,9% przypadków, przy 2 czynnikach – ZMO w 6,8% przypadków, a przy występowaniu 3 czynników ZMO obserwuje się w ok. 13% przypadków [1]. Obniżenie ciepłoty ciała chorego podczas operacji opóźnia gojenie się rany pooperacyjnej i zwiększa ryzyko ZMO. Jeśli temperatura ciała obniżyła się do 34°C, to częstość ZMO wynosiła około 19%, zaś jeśli podczas operacji utrzymywano ciepłotę ciała na poziomie 36,6°C, to ZMO wystąpiło w 6% przypadków [19]. Okołooperacyjne ogrzewanie chorych poddawanych np. mastektomii z powodu nowotworu jest tak samo skuteczne w zapobieganiu ZMO jak profilaktyka antybiotykowa. Zapobieganie oziębieniu chorego w sali operacyjnej jest tanią i skuteczną profilaktyką ZMO [8].

Radioterapia przedoperacyjna podwaja liczbę powikłań septycznych w gojeniu się rany kroczowej po brzuszno-kroczowym wycięciu odbytnicy z 21% (bez radioterapii) do 48% w grupie chorych po radioterapii .

Ostatnio podważa się celowość mechanicznego przygotowania jelita grubego przed planową resekcją. Wyniki badań prospektywnych, randomizowanych, kontrolowanych nie potwierdzają koncepcji, że mechaniczne przygotowanie jelita grubego redukuje częstość nieszczelności zespolenia i innych powikłań septycznych w chirurgii jelita grubego. Rutynowe, mechaniczne przygotowanie jelita grubego do operacji jest nieuzasadnione. Wkłucia centralne odpowiedzialne są za około 30% zakażeń rozprzestrzeniających się drogą krwionośną. Obowiązuje dokładna pielęgnacja wkłucia [7, 17]. Właściwe leczenie cukrzycy i kontrolowanie hiperglikemii w istotnym stopniu obniża pooperacyjne powikłania septyczne [23]. Odsetek zakażeń miejsca operowanego zwiększa się wprost proporcjonalnie do długości oczekiwania i hospitalizacji przed operacją. Im dłuższy okres hospitalizacji przed operacją tym wyższy procent zakażeń ZMO. Szczególnie niekorzystnym czynnikiem jest przenoszenie wcześniejsze chorych z innego oddziału na oddział chirurgiczny. Wiąże się to z inną florą bakteryjną, innymi schematami antybiotykoterapii i kontaktami z nosicielami. Najlepiej byłoby aby pacjent był operowany w dniu przyjęcia, podobnie jak postępuje się z chorym operowanym ze wskazań pilnych i nagłych [1].

3. Najczęstsze patogeny w zakażeniach chirurgicznych

Najczęstszymi patogenami w zakażeniach chirurgicznych są zarówno flora bakteryjna zasiedlająca skórę pacjentów jak i flora skóry członków zespołu operacyjnego co stanowi przyczynę zakażeń chirurgicznych w ponad 50% przypadków. U chirurgów najwięcej bakterii stwierdzono na skórze czoła, brwi i w małżowinach usznych. Gronkowiec złocisty i gronkowce koagulazo-ujemne są najczęstszymi przyczynami ZMO i stwierdza się je wokoło 17–25% przypadków [15]. Inne patogeny to *Escherichia coli* (w 8% przypadkach), szczepy *Enterococcus* (w ok. 12% przypadkach), *Pseudomonas aeruginosa* (w 8%), szczepy *Enterobacter* (w 7%), paciorkowce (w 6%), szczepy *Klebsiella,* beztlenowce (np. *Bacteroides fragilis*). W przypadkach stosowania ciał obcych (protezy, siatki, dreny), gronkowce koagulazo-ujemne (CNS) są znacznie częściej przyczyną zakażenia implantu i miejsca operowanego.

Bakterie beztlenowe (*Bacteroides*, *Peptostreptococcus*), pałeczka zgorzeli gazowej (zwłaszcza w tkankach niedokrwionych) są charakterystyczne dla zakażeń po operacjach w zakresie jamy brzusznej. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii* powodują szczególnie trudne do leczenia zakażenia miejsca operowanego ze względu na wieloraką oporność na antybiotyki. *Serratia* spp. są zwykle niepatogenne, ale u chorych z obniżoną odpornością są drobnoustrojami chorobotwórczymi. W ropniach i przetokach występują grzyby (*Histoplasma, Coccidioides, Candida, Nocardia, Actinomyces*).

W patogenezie zakażeń istotną rolę odgrywa liczba bakterii (stopień skażenia rany), ich wirulencja, odporność zakażonego organizmu oraz jakość techniki operacyjnej.

Czynniki ryzyka ZMO można sklasyfikować także na płaszczyźnie poddających sie modyfikacji lub nie. Znajomość ich występowania w kategorii indywidualnego podejścia do pacjenta w znaczący sposób wpływa na redukcję przypadków infekcji. Istotnym jest także rodzaj zabiegu operacyjnego, ponieważ każdy rodzaj zabiegu ma swoją specyficzną florę fizjologiczną, która może spowodować zakażenie [15].

4. Zakażenia miejsca operowanego po operacjach kardiochirurgicznych

Powikłania infekcyjne u pacjentów po zabiegach kardiochirurgicznych stanowią jedno z najgroźniejszych powikłań. Możemy tu wyróżnić zakażenia związane z miejscem dostępu chirurgicznego czyli ranę po przecięciu mostka oraz ranę w miejscu pobrania materiału do przęsłowania tętnic wieńcowych [4]. Częstość występowania tych powikłań wynosi od 0,4% do 30%, z czego pooperacyjne zapalenie śródpiersia szacuje się na poziomie 0,4–5% [4, 13, 22]. W 7–30% dochodzi do zgonu pacjentów [14, 22]. Zakażenia stanowią jedno z najpoważniejszych powikłań po zabiegach na otwartym sercu i w dużym odsetku są przyczyną wydłużonego czasu hospitalizacji pacjenta [11, 20], przez co generują wysokie koszty leczenia. Mają one duży wpływ na zwiększenie odsetka zachorowalności oraz umieralności szpitalnej, która szacuje się na poziome od 0 do 25% [6]. Za rosnącą liczbę zakażeń po tych zabiegach, odpowiada narastająca stale antybiotykooporność patogenów kolonizujących rany, oraz stosowanie nowych technik przeprowadzanych zabiegów.

Wiele publikacji opisuje bardzo szeroką gamę czynników, które przyczyniają się do rozwoju powikłań infekcyjnych w tej grupie pacjentów. Możemy tu wyróżnić m.in. współwystępowanie ciężkich chorób, które negatywnie wpływają na szybkość gojenia się rany pooperacyjnej. Są to przede wszystkim schorzenia takie jak: cukrzyca, przewlekła obturacyjna choroba płuc, niewydolność nerek, osteoporoza, zapalne choroby skóry, choroby z towarzyszącym upośledzeniem odporności czy też niewydolność mięśnia lewej komory serca z frakcją wyrzutową < 40% [23]. Do innych czynników związanych z pacjentem zaliczamy – płeć żeńską, otyłość, niedożywienie, nadużywanie tytoniu czy też stosowanie leków sterydowych lub immunosupresyjnych. Wpływ ma również tryb przeprowadzenia operacji – tryb nagły zwiększa ryzyko infekcji, transfuzje w okresie okołooperacyjnym, resuscytacja sercowa oraz reoperacje. Możemy wyróżnić również czynniki związane z zabiegiem i okresem pooperacyjnym. Zaliczamy tu miedzy innymi technikę przeprowadzanego zabiegu. Niektóre doniesienia podają, że użycie obu tętnic piersiowych wewnętrznych jako bypassów naczyniowych zwiększa ryzyko zakażeń jak również sternotomia poza linią środkową ciała, nieoptymalne zamknięcie klatki piersiowej oraz powtórna sternotomia (głównie z powodu krwawienia). Ryzyko zwiększa także długi czas trwania zabiegu, stosowanie krążenia pozaustrojowego, hipotermia, niewłaściwa kontrola temperatury ciała, poziomu glikemii, hemodylucja, małe stężenie hemoglobiny, zaburzenie perfuzji, hipotensja, hiperglikemia, przedłużony pobyt na oddziale intensywnej terapii oraz czas mechanicznej wentylacji. Podczas operacji i w okresie pooperacyjnym nie powinno dopuszczać się do hiperglikemii – wprowadzono w związku z tym tak zwany protokół portlandzki zalecający utrzymanie glikemii w tych okresach na poziomie 100–150 mg/dl [4]. Do innych czynników często wymienianych w literaturze jest stosowanie podczas zabiegów żylnych wkłuć głębokich, cewników Swan'a-Ganz'a czy też balonów do kontrapulsacji wewnątrzaortalnej [13]. Na ich powierzchni kolonizują się bakterie, które stanowią potencjalne źródło infekcji. V. Le Guillou i wsp., w swojej pracy udowodnili, że użycie żylnych cewników do wkłuć centralnych zwiększa częstość występowania zakażeń miejsca operowanego. Spośród 133 pacjentów u których pojawiło się to powikłane u 12 (5–15%) miało związek z użyciem cewników centralnych. Wiadome jest również to, że na rozwój zakażenia w miejscu ingerencji w tkanki ma obecność odległych źródeł infekcji [13]. Ryzyko to zwiększa m.in. współistnienie infekcji płuc czy dróg moczowych. Wczesnym powikłaniem pooperacyjnym, mogącym przenieść się na sąsiadujące tkanki jest zakażenie wsierdzia. Dominuje tu zakażenie gronkowcami koagulazoujemnymi rzadziej *S. aureus, Corynebacterium* czy nadkażenie grzybami *Candida albicans* i *Aspergillus* (0,8–3,9%). Badanie J. Gualis i wsp. wykazało, że obecność dodatnich posiewów krwi w okresie pooperacyjnym stanowi niezależny czynnik ryzyka rozwoju SSIs, dlatego u takich pacjentów zaleca się stosowanie agresywnej terapii przeciwbakteryjnej celem minimalizacji rozwoju zakażenia. Stosowanie profilaktycznej antybiotykoterapii zmniejsza ryzyko rozwoju SSIs z 10% do 2% [22].

Bakteriami które najczęściej zakażają rany po operacjach kardiochirurgicznych są gronkowce złociste (*S. aureus*) oraz koagulazonegatywne gronkowce (CoNS). Są to bakterie, które stanowią fizjologiczną florę bakteryjną skóry i w trakcie zabiegu mogą zostać przeniesione na głębiej leżące tkanki. Z tego powodu bardzo ważne jest właściwe przygotowanie pacjenta przed zabiegiem chirurgicznym. Zalecana jest przedoperacyjna kąpiel antyseptyczna w przeddzień lub w dniu operacji, przedoperacyjne usunięcie owłosienia, antyseptyczne przygo-

towanie skóry z użyciem chlorheksydyny lub povidone iodine przed nacięciem skóry. Publikacja S e r o p i a n'a i wsp., wykazała że stosowanie maszynki elektrycznej do golenia miejsca, w którym będzie przeprowadzony zabieg kardiochirurgiczny wiązało się z występowaniem SSI w ok. 5,6% zaś użycie w tym celu kremu do depilacji znacznie ograniczało to ryzyko do 0,6%. Istotne jest również rygorystyczne przestrzeganie zasad antyseptyki przez personel medyczny tj., używanie sterylnych rękawiczek chirurgicznych, dwóch par rękawiczek oraz ich rutynowych zmian podczas zabiegu [4]. Podejmowane są również próby eliminacji potencjalnych źródeł zakażenia pochodzących ze środowiska sali operacyjnej i sal pooperacyjnych. Dużą rolę odgrywa tu proces czyszczenia, dezynfekcji, sterylizacji urządzeń i narzędzi operacyjnych. Ważna jest odpowiednia wentylacja tych pomieszczeń oraz stosowanie filtrów HEPA (usuwają cząstki o średnicy > 0,3 mikrona) celem uzyskania „ultraczystego" powietrza [4].

5. Zakażenia u pacjentów po wszczepieniu stymulatora oraz kardiowertera defibrylatora

Zakażenia u pacjentów po wszczepieniu stymulatora (PM) lub kardiowertera defibrylatora serca (ICD) stanowią coraz większy problem. W przeszłości częstość infekcji szacowała się dla stymulatorów serca na poziomie 0,13–19,9% a dla ICD 0,8% [29, 26]. W ciągu ostatniej dekady zaobserwowano wzrost ich występowania o 124%. Pomimo faktu, że wskaźnik infekcji systematycznie rośnie, obecnie nie ma wystarczająco dużych badań, które jednoznacznie potwierdzałyby te spostrzeżenia. Niektóre doniesienia podają, że częstość występowania infekcji u pacjentów ze stymulatorem oraz ICD szacuje się na poziomie 1–7% [5]. Wg P.B. N e r y i wsp. częstość występowania powikłań infekcyjnych u pacjentów ze stymulatorem wynosi 0,5–6% a u pacjentów z ICD – 1,2–1,8% [18]. Wg innych doniesień częstość dla stymulatorów szacuje się na poziomie 0,13–12,6% [21, 29].

Wzrost liczby zakażeń w ciągu ostatnich lat, związany jest z coraz większą liczbą wykonywanych zabiegów. Z kolei rosnąca liczba implantacji urządzeń do elektroterapii wiąże się z poszerzaniem wskazań do ich stosowania oraz dłuższym przeżyciem pacjentów z chorobami serca [25, 29]. Zauważono również, że wskaźnik hospitalizacji z powodu zakażeń po wszczepieniu PM/ICD rośnie szybciej niż wskaźnik wykonywanych zabiegów [30]. Stymulatory serca oraz kardiowertery defibrylatory są coraz częściej stosowane w skali ogólnoświatowej jak również są coraz lepiej akceptowaną przez pacjentów formą leczenia bradyarytmii serca. Na świecie żyje około 3,25 milionów pacjentów z wszczepionym układem stymulującym oraz około 180 000 po implantacji ICD [5].

Zakażenia po wszczepieniu urządzenia mogą manifestować się w różnoraki sposób. Najczęstszą formą jest wczesne zakażenie loży stymulatora/ICD rozwijające się zazwyczaj w ciągu pierwszego roku po implantacji (do 3 miesięcy) lub jako późne powikłanie pod postacią odelektrodowego zapalenia wsierdzia [27]. Jako odległe powikłanie czasem może pojawić się późne zapalenie kieszonki urządzenia rozwijające się po 1 roku od implantacji (1–10 lat) [27]. Podczas obserwacji pacjenta po zabiegu bardzo ważne jest zwrócenie uwagi na to czy nie rozwija się miejscowy stan zapalny w okolicy rany. Jest to istotne ponieważ w znacznym odsetku (80%) nie towarzyszą temu objawy ogólnoustrojowe a pacjenci często ignorują miejscowy odczyn zapalny [27, 29]. Objawy kliniczne towarzyszące infekcji miejscowej to najczęściej: zaczerwienienie, ból, obrzęk, zwiększone ocieplenie tkanek, miejscowa nadwrażliwość, chełbotanie i ścieńczenie skóry nad stymulatorem, rozejście się brzegów rany, ropny wyciek z rany, odleżyna nad stymulatorem lub elektrodą, przebicie urządzenia przez skórę [12, 25, 27, 29]. Odleżyna jest spowodowana niedokrwieniem tkanek bezpośrednio przylegających do ciała obcego, a nadkażenie jest wówczas procesem wtórnym [26]. Niektóre doniesienia sugerują, że podstawowym mechanizmem w wyniku, którego dochodzi do rozwoju miejscowych zmian zapalnych jest wytworzenie otwartej odleżyny w miejscu przebiegu elektrody lub nad stymulatorem/ICD [24]. Podstawą rozpoznania jest dodatni wynik badania mikrobiologicznego materiału pobranego z loży urządzenia. Choć izolowany zapalny odczyn miejscowy jest najczęstszą formą powikłania infekcyjnego u pacjentów z PM/ICD, w niektórych przypadkach dochodzi do rozwoju bakteriemii, bądź szerzenia się infekcji przez ciągłość wzdłuż elektrod i układu żylnego, prowadząc do rozwoju zapalenia wsierdzia (CDRIE) [25, 29]. Stanowi ono około 10% spośród wszystkich form powikłań infekcyjnych u pacjentów po implantacji PM/ICD [29, 33]. Możemy wyróżnić grupy ryzyka, u których endocarditis występuje znacznie częściej. Są to narkomani, starsi ludzie ze zmianami degeneracyjnymi zastawek, osoby ze sztucznymi zastawkami, pacjenci często hospitalizowani, hemodializowani [26].

Głównymi objawami klinicznymi, które towarzyszą CDRIE są gorączka, dreszcze, złe samopoczucie, ogólne wyniszczenie organizmu [29]. Podstawą do rozpoznania CDRIE jest stwierdzenie dodatniego wyniku posiewów krwi i/lub z końcówki elektrody oraz wykazanie obecności wegetacji na podstawie przezprzełykowego badania echokardiograficznego [29]. Wegetacje mogą lokalizować się w świetle żyły podobojczykowej, żyły głównej górnej, na zastawce trójdzielnej, wsierdziu prawego przedsionka i prawej komory jak również na elektrodzie PM/ICD. Wyróżniamy dwa główne mechanizmy prowadzące do rozwoju CDRIE. Są to: zanieczyszczenie układu stymulującego fizjologiczną florą bakteryjną

skóry w miejscu gdzie wszczepiane jest urządzenie, jak również zakażenie drogą krwiopochodną na skutek wysiewu bakterii z odległego ogniska zakażenia [12, 24]. Powikłania infekcyjne rzadziej rozwijają się u pacjentów po pierwszym zabiegu implantacji (1,4%; 95% przedział ufności: 0,9–1,9%) w stosunku do kolejnych interwencji (6,5%; 95% przedział ufności: 3,3–9,7%) takich jak: wymiana urządzenia, reoperacja, zabiegi naprawcze [10, 27]. W badaniu przeprowadzonym w Mayo Clinic na 189 przypadkach, zakażenia po pierwszym w życiu zabiegu wystąpiły u 79 pacjentów tj. 42%, zaś u 110 tj. 58%, powikłania infekcyjne wystąpiły po kolejnej interwencji [29]. Widać tu, że ponowna ingerencja w tkanki, stanowi istotny czynnik ryzyka zakażeń. Doniesienia podają, że ryzyko infekcji związane z powtórnymi zabiegami jest większe z powodu formowania się blizny oraz zrostów w okolicy loży stymulatora, czego efektem jest upośledzone ukrwienia tkanek a w związku z tym redukcja przenikania komórek odpornościowych [10, 27].

Czynniki ryzyka powikłań infekcyjnych u tych pacjentów możemy podzielić na te, które związane są z pacjentem, oraz czynniki uzależnione od zabiegu. Do pierwszej grupy zaliczamy: wiek (im młodszy pacjent tym większe ryzyko powikłań infekcyjnych) [12], płeć męską, stan odżywienia (pacjenci otyli jak i nadmiernie wyniszczeni są bardziej obciążeni), choroby towarzyszące (cukrzyca, niewydolność nerek, zapalne choroby skóry, choroby nowotworowe, schorzenia którym towarzyszy upośledzenie odporności, niewydolność serca), stosowanie leków antykoagulacyjnych lub sterydoterapia, różnego rodzaju wkłucia naczyniowe, cewniki w tym cewnik w pęcherzu moczowym [12, 27, 29]. Istotnym czynnikiem ryzyka jest również epizod gorączki w ciągu 24 h przed implantacją [25]. Wśród drugiej grupy tj. czynników związanych z zabiegiem, możemy wyróżnić: sposób antyseptyki miejsca operowanego przed implantacją, profilaktykę antybiotykową przed i okołozabiegową, czas wygolenia miejsca implantacji urządzenia w stosunku do początku zabiegu, czas trwania zabiegu, ponadto bardzo istotne jest również doświadczenie operatora [26, 27]. Zauważono, że powikłania infekcyjne rzadziej rozwijają się jeśli operator wykonał ponad 100 zabiegów – wtedy ryzyko zakażenia spada w sposób istotny. Wg niektórych autorów z 18,9% do 0,9% [10, 27]. Wykazano również, że zastosowanie elektrody do czasowej elektrostymulacji jako zabezpieczenia przed właściwym zabiegiem, ponowna interwencja z powodu krwiaka lub przemieszczenia elektrody także stanowią istotny czynnik ryzyka rozwoju infekcji [25]. Dodanie każdej kolejnej elektrody (powyżej 2) do już umieszczonych, zwiększa powierzchnię kolonizacji bakterii i zapewnia większą powierzchnię, na której mogą formować się wegetacje [30]. Z tego powodu każde kolejne ciało obce sprzyja zakażeniom.

Obecnie zaleca się zdezynfekowanie miejsca zabiegu bezpośrednio przed nacięciem skóry dwoma preparatami antyseptycznymi z różnymi substancjami czynnymi (m.in., chlorheksydyną). Zaleca się również stosowanie sterylnych rękawic. Golenie miejsca operowanego powinno nastąpić na ok. 2 h przed rozpoczęciem ingerencji w tkanki. Wykonanie tej czynności na dzień przed, niesie ze sobą zwiększone ryzyko rozwoju powikłania infekcyjnego. Dzieje się tak ponieważ podczas golenia dochodzi do uszkodzenia naskórka, a w miejsca tych mikroskopijnych zmian wnikają i namnażają się bakterie stanowiące florę fizjologiczną skóry [27]. Zaliczamy tu m.in. *S. epidermidis*, który w ok. 42% stanowi źródło zakażeń [29]. Antybiotyki powinno podawać się wcześniej – ok. 30–60 min. przez zabiegiem, aby zapewnić odpowiednie stężenie w surowicy oraz właściwe nasycenie tkanek przed implantacją. Stężenie to powinno być utrzymana również podczas trwania zabiegu jak i na kilka godzin po. Po to, aby zredukować ryzyko infekcji w przedłużającym się zabiegu (ponad 2 h) należy podać dodatkową dawkę antybiotyku [27]. Większe dawki powinno stosować się również u pacjentów obciążonych ciężkimi chorobami współistniejącymi jak również podczas kolejnych zabiegów w tej okolicy [27]. Redukuje to w istotny sposób prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia.

Drobnoustroje infekujące stymulatory oraz ICD obejmują szerokie spektrum różnorodnych gatunków, mogących mieć różne źródła zakażenia. Wyniki badań wielu autorów przedstawiają podobny rozkład częstości występowania określonych gatunków patogenów. Do drobnoustrojów, które w głównej mierze kolonizują te urządzenia zaliczamy: *S. epidermidis* 42–68%, *Staphylococcus aureus* – 24–45%, *E. coli* – do 22%, *Klebsiella* – do 9%, *Enterococcus* – do 8%, *Streptococcus* – 6% i inne 14% [5, 21, 29, 30]. Spośród dwóch głównych patogenów, *S. aureus* szybciej prowadzi do rozwoju stanu zapalnego i zakażenia w porównaniu z *S. epidermidis* [3, 24]. Wykazano także, iż *S. aureus* w większym odsetku kolonizuje ICD niż PM w przeciwieństwie do *S. epidermidis*, który częściej namnaża się na elektrodach stymulatora niż ICD [29]. Badanie A. Da C o s t a i wsp. [24] wykazało, że chodź *S. epidermidis* reprezentuje grupę patogenów najczęściej kolonizujących układy stymulujące, to rzadko odpowiada za kolejne epizody powikłań infekcyjnych [24]. Bakteria ta, stanowi florę fizjologiczną skóry i śluzówek. Jest też najczęściej izolowanym patogenem okolicy kieszonki PM/ICD. Posiada ona zdolność wytwarzanie śluzowej macierzy (*slime layer*), która jest wczesnym etapem formułowania biofilmu. Struktura ta jest utworzona z kolonii ściśle przylegających do siebie bakterii, w związku z czym w znacznym stopniu ogranicza lub całkowicie upośledza penetrację antybiotyków. Wszechobecność tej

bakterii u pacjenta, personelu medycznego, jak również osób z otoczenia chorego uzasadnia zalecenia do prowadzenia intensywnej profilaktyki okołozabiegowej. Patogenami z grupy Gram-ujemnych, które również mają tendencje do tworzenia śluzowej macierzy, to głównie pałeczka ropy błękitnej lub tworzące biofilm *Klebsiella, Proteus, Serratia.* Bakterie z tej grupy w większości stanowią fizjologiczną florę jelit, która w szczególnych przypadkach może być źródłem zakażenia elektrod PM/ICD oraz kieszonki [26].

6. Metody zapobiegania ZMO

Tak więc ZMO najczęściej rozwija się w wyniku skażenia rany drobnoustrojami egzogennymi i endogennymi znajdującymi się na skórze, błonach śluzowych, w przewodzie pokarmowym, oddechowym i moczowym pacjenta. Najczęstsza flora patogenna w ZMO w zależności od miejsca operacji to pałeczki Gram-ujemne, beztlenowce, pałeczki jelitowe w przypadku operacji w zakresie jamy brzusznej a ziarenkowce Gram-dodatnie w przypadku operacji kardiochirurgicznych. Według ostatnich doniesień w piśmiennictwie światowym określono wachlarz czynników mający wpływ na zmniejszenie ZMO.

1. Czystość sali operacyjnej

Określa konieczność stosowania odpowiednich filtrów HEPA, laminarnego przepływu powietrza, ograniczenia ilości personelu i używanego sprzętu na sali do niezbędnego minimum. Perforacja rękawiczek chirurga w trakcie zabiegu powoduje kontaminacje miejsca operowanego. Zaleca się stosowanie podwójnych rękawiczek [17].

2. Kąpiel pacjenta z użyciem związków antyseptycznych

ZMO w warunkach czystej rany są zazwyczaj spowodowane szczepami skórnymi. Istnieją sposoby na zmniejszenie ilości bakterii kolonizujących skórę pacjenta. Mikroorganizmy występujące w gruczołach skórnych nie są wystawione na działanie środków antyseptycznych. Skuteczniejsze długoterminowe działanie chlorheksydyny od innych środków np. heksachlorofenu czy jodowany powidon powoduje, że stała się związkiem z wyboru. Kąpiel całego ciała na wieczór przed zabiegiem oraz powtórna tuż przed wpływa na redukcję kolonii niż pojedyncza kąpiel tuż przed samym zabiegiem [32].

3. Usunięcie owłosienia

Najbardziej korzystną metodą jest usuwanie owłosienia tuż przed zabiegiem używając golarek unikając uszkodzenia naskórka [23, 32].

4. Odkażanie skóry rąk

Zmniejszenie ilości bakterii na rękach wpływa znacząco na ilość ZMO. 2–3 minutowe szorowanie rąk z zastosowaniem chlorheksydyny znacząco wpływa na redukcje ilości szczepów skórnych. Najlepsze rezultaty otrzymuje się stosując antyseptyki na bazie jodyny lub chlorheksydyny [32].

5. Samoprzylepne folie

Nie udowodniono w sposób jednoznaczny, że stosowanie samoprzylepnych folii wpływa na zmniejszenie ilości przypadków ZMO. Przy prawidłowym przyklejeniu odpowiedniej folii (z dodatkiem bakteriostatyków) unikając unoszenia się jej brzegów w pobliżu rany – zakażenie rany szczepami skórnymi wydaje się być niemożliwe. Wyroby cyjanoakrylowe obecnie niosą nadzieje na przełom w tej materii jednak wymagane są dodatkowe badania [23, 32].

6. Zastosowanie szwów przeciwbakteryjnych

Plecione szwy powodują 10 000 wzrost ilości bakterii niezbędnych do powstania zakażenia w ranie. Monofilamenty wykazują zdolność do mniejszej adhezji bakterii oraz redukują ich liczbę w ranie. Szew ciągły niesie ze sobą mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji w ranie niż szwy pojedyncze – prawdopodobnie z powodu mniejszej ilości martwiczych tkanek. Nasączenie szwów środkami antybakteryjnymi może wpłynąć korzystnie na proces gojenia sie jej, jednak wymagane są dodatkowe badania w tym zakresie [8].

7. Drenaż

Drenaż założony przez ranę operacyjną zwiększa prawdopodobieństwo ZMO. Zamknięty drenaż usuwający płyny z okolicy rany sam w sobie nie zmniejsza prawdopodobieństwa wystąpienia ZMO [32].

Aby zapobiegać rozwojowi zakażeń bakteryjnych powszechne jest profilaktyczne podawanie antybiotyków. Lekiem podawanym z wyboru u pacjentów bez wysokiego ryzyka infekcji jest antybiotyk b-laktamowy. Wykazano, że szczególnie skuteczne jest podawanie cafazoliny [5]. U pacjentów ze zwiększonym ryzykiem tj. u których wystąpiła kolonizacja *S. aureus*, z dużym ryzykiem kolonizacji (leczeni innymi antybiotykami, przeniesieni z innych szpitali, hospitalizowani > 3 dni), z wszczepionymi sztucznymi zastawkami lub przeszczepami naczyniowymi lub gdy w środowisku szpitalnym obecne są MRSA pomocniczo podaje się wankomycynę. Rutynowo przed zabiegiem kardiochirurgicznym stosowana jest mupirocyna celem dekontaminacji nosa. Zaleca się ją u wszystkich pacjentów u których nie ma udokumentowanego ujemnego testu na kolonizację *S. aureus*. W wielu publikacjach udowodniono bowiem, że rozwój zakażeń miejsca operowanego ma

związek z nosicielstwem *S. aureus*. Minimalizowanie ryzyka infekcji jest bardzo ważne, dlatego kładzie się nacisk na przeprowadzanie zabiegu ze szczególną dbałością o szczegóły. Sternotomię powinno się wykonywać w linii pośrodkowej, ważne jest również aby unikać użycia obu tętnic piersiowych wewnętrznych u pacjentów z podwyższonym ryzykiem SSIs. Zamknięcie sternotomii powinno się wykonywać przy użyciu 8 zwykłych pojedynczych lub podwójnych stalowych drutów, zeszycie powięzi, tkanki podskórnej, skóry wykonując dwa rzędy szwów oraz sternotomia – przy użyciu trzech rzędów szwów, stosowanie szwów antybakteryjnych, a w fazie końcowej oczyszczenie zeszytej skóry. Ważne jest aby w miarę możliwości minimalizować czas trwania zabiegu, szczególnie wtedy gdy stosuje się krążenie pozaustrojowe. Odpowiednia higiena rany pooperacyjnej stanowi także istotny problem. Powinno się dbać o systematyczną zmianę opatrunków (pierwsza zmiana w 2 dniu po zabiegu) oraz stosowanie osobnych opatrunków na ranę pooperacyjną i wokół drenów. Czas gojenia rany powinien być objęty szczególnym nadzorem przede wszystkim we wczesnym okresie po zabiegu. Wykazano bowiem, że ścisła kontrola procesu gojenia rany pooperacyjnej wiązała się ze znacznym zmniejszeniem liczby zakażeń w tym miejscu [1].

7. Podsumowanie

Biorąc pod uwagę częstość zakażeń miejsca operowanego oraz poważne skutki zdrowotne pacjentów prowadzi się ocenę ryzyka zakażenia rozpatrując głównie czynniki modyfikowalne. Ryzyko zakażenia wiąże się ze stanem klinicznym pacjenta, warunkami środowiskowymi a przede wszystkim istotne jest źródło zakażenia. Jak wykazano, częste źródło zakażenia stanowi flora fizjologiczna pacjenta. Bakterie jelitowe w przypadku operacji na jamie brzusznej oraz flora skóry w przypadku operacji kardiologicznych. Działania zmierzające do zmniejszenia ryzyka zakażenia flora endogenną obejmują skrócenie pobytu pacjenta w szpitalu, profilaktyczna eradykacja MRSA z błony śluzowej przedsionków nosa, szereg zabiegów higienicznych przed operacją, odpowiednia profilaktyka okołooperacyjna i właściwa pielęgnacja rany.

Piśmiennictwo

1. Bielecki K.: Zakażenia chirurgiczne. Wyd. Med. Borgis, Warszawa 2007
2. Biondo S, Kreisler E, Fraccalvieri D, Basany EE, Codina-Cazador A, Ortiz H.: Risk factors for surgical site infection after elective resection for rectal cancer. A multivariate analysis on 2131 patients. *Colorectal Dis.* **14**, e95–e102 (2012)
3. Bluhm G. i wsp.: Pacemaker infections: a clinical study with special reference to prophylactic use of some isoxazolyl penicillins. *Acta Med. Scand.* **699**, 1–62 (1985)
4. Borowiec J.W.: Infekcje rany dostępu chirurgicznego w kardiochirurgii – „Wizja Zero". *Kardiochirurg. i Torakochirurg. Pol.* **7**, 383–387 (2010)
5. Chua J.D., Wilkoff B.L., Lee I. i wsp.: Diagnosis and Management of Infections Involving Implantable Electophysiologic Cardiac Devices. *Ann. Intern. Med.* **133**, 604–608 (2000)
6. Dohmen P.M., Konertz W.: A review of current strategies to reduce intraoperative bacterial contamination of surgical wounds. *GMS Krankenhhyg. Interdiszip.* 2, (2007)
7. Fry D. Colon preparation and surgical site infection. *American J. Surgery*, **202**, 225–232 (2011)
8. Gagliardi A.R., Fenech D., Eskicioglu C., Nathens A.B., McLeod R.: Factors influencing antibiotic prophylaxis for surgical site infection prevention in general surgery: a review of the literature. *Can. J. Surg.* **52**, 481–489 (2009)
9. Ortega G., Rhee D.S., Papandria J.D., Yang J., Ibrahim A., Shore A.D., Martin A.: An Evaluation of Surgical Site Infections by Wound Classification System Using the ACS-NSQIP. *J. Surgical Res.* 1–6 (2011)
10. Harcombe, Newell S., Ludman P.F.: Late complication following permanent pacemaker implantation or elective unit replacement. *Heart*, **80**, 240–244 (1998)
11. Hollenbeak C.S., Murphy D.M., Koenig S., Woodward R.S.: The clinical and economic impact of deep chest surgical site infections following coronary artery bypass graft surgery. *Chest*, **118**, 397–402 (2000)
12. Johansen J.B, Jorgensen O.D.: Infection after pacemaker implantation: infection rates and risk factors associated with infection in a population based cohort study of 46299 consecutive patients. *Eur. Heart J.* **32**, 991–998 (2011)
13. Le Guillou V., Tavolacci MP., Baste J.M.: Surgical site infection after central venous catheter-related infection in cardiac surgery. Analysis of a cohort of 7557 patients. *J. Hosp. Infect.* **79**, 236–241 (2011)
14. Lee Y.P., Feng M.C., Wu L.C.: Outcome and risc factor associated with surgical site infections after cardiac surgery in Taiwan Medical Center. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **43**, 378–385 (2010)
15. Meakins J.: Prevention of postoperative infection. Basic surgical and perioperative consideration. ACS Surgery: Principles and Practice 2008
16. Múñez E., Ramos A., Espejo T.Á., Vaqué J., Sánchez-Payá J., Pastor V., Asensio A.: Microbiology of surgical site infections in abdominal tract surgery patients. *Cir. Esp.* **89**, 606–612. Epub (2011)
17. Nelson R.L., Glenny A.M., Song F.: Antimicrobial prophylaxis for colorectal surgery The Cochrane Collaboration. Published by JohnWiley & Sons, Ltd. 2009
18. Nery P.B., Fernandes R., Nair G.M.: Device-Related Infection Among Patients With Pacemakers and Implantable Defibrillators: Incidence, Risk Factors and Consequences. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **21**, 786–790 (2012).
19. O'Grady H., Baker E.: Prevention of surgical site infection. *Surgery*, **29**, 10 (2011)
20. Paul M., Raz A., Leibovici L.: Sternal wound infection after coronary artery bypass graft surgery: validation of existing risk scores. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **133**, 397–403 (2007)
21. Uslan D.Z., Sohail M.R.: Permanent pacemaker and Implantable Cardioverter Defibrillator Infection. *Arch. Intern. Med.* **167**, 669–675 (2007)

22. Gualis J., Flórez S., Tamayo E.: Risc factor for mediastinitis and endocarditis after cardiac surgery. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.* **17**, 612–616 (2009)
23. Cheadle W.G.: Risk factors for surgical site infection. *Surg. Infect.* (*Larchmt*), **7**, Suppl. 1, S7–11 (2006)
24. Da Costa A., Lelievre H., Kirkorian G.: Role of the Preaxillary Flora in Pacemaker Infections. A prospective study. *Circulation*, **97**, 1791–1795 (1998)
25. Klug D., Mamadou B., Pavin D.: Risk Factors Related to Infections of Implanted Pacemakers and Cardioverter Defibrillators. Results of a Large Prospective Study. *Circulation*, **116**, 1349–1355 (2007)
26. Mazurek M., Grzegorzewski B., Kargul W.: Infekcje systemów stymulujących serce i kardiowerterów defibrylatorów. *Kardiol. Pol.* **67**, 305–309 (2009)
27. Michałowski D., Kutarski A.: Infekcja loży po pierwszej implantacji układu oraz po zabiegu powtórnym – różnice. Specyfika postępowania antyseptycznego przy implantacji i reoperacji układu stymulującego – elementy dyskusyjne. *Fol. Cardiol.* **4**, 73–77 (2009)
28. Quinn A., Hill A.D., Humphreys H.: Evolving issues in the prevention of surgical site infections. *Surgeon*, **7**, 170–172 (2009)
29. Sohail M.R., Uslan D.Z., Khan A.H. i wsp.: Management and Outcome of Permanent Pacemaker and Implantable Cardioverter – Defibrillator Infections. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1851–1859 (2007)
30. Sohail M.R., Uslan D.Z., Khan A.H.: Risk factor Analysis of Permanent Pacemaker Infection. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 166–173, (2007)
31. Utsumi M., Shimizu J., Miyamoto A., Umeshita K., Kobayashi T., Monden M., Makimoto K.: Age as an independent risk factor for surgical site infections in a large gastrointestinal surgery cohort in Japan. *J. Hosp. Infect.* **75**, 183–187 (2010)
32. Wesley A., Solomkin J., Edwards M.: Updated Recommendation for Control of Surgical Site Infection. *Ann. Surg.* **253**, 1082–1093 (2011)
33. Wożakowska-Kapłon B., Wesołowska K., Kutarski A.: Odelektrodowe zapalenie wsierdzia jako późne powikłanie po implantacji stymulatora. *Kardiol. Pol.* **69**, 265–269 (2011)

SPIS TREŚCI

J. Struzik, M. Niemiałtowski – Badania modelowe nad patogenezą ospy prawdziwej: wpływ ortopokswirusów krowianki, ospy myszy i ospy bydła na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB 155
I. Stolarzewicz, A. Kapturowska, E. Białecka-Florjańczyk – Mikrobiologiczne źródła barwników w technologii żywności 167
D. Białoszewski, E. Bocian, S. Tyski – Ozonoterapia oraz zastosowanie ozonu w dezynfekcji ... 177
M. Popiel, E. Wietrak, T. Laskus – Opryszczkowe zapalenie mozgu 185
A. Żuk-Wasek – Charakterystyka białek wirusa Epsteina-Barr – ich udział w zakażeniu latentnym i powiązanie z procesami nowotworzenia 191

XXVII ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW
5–8 września 2012 r., Lublin

E. A. Trafny – Jak zdobyć i wykorzystać wiedzę o wielogatunkowych biofilmach? 205
E. Mazur – Diagnostyka ostrych zakażeń górnych dróg oddechowych (gdo) – dobór materiałów i problemy interpretacyjne związane z obecnością flory fizjologicznej i nosicielstwem 213
D. Strzelec-Nowak, A. Bogut, J. Niedźwiadek, M. Kozioł-Montewka, A. Sikora – Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń implantów stawu biodrowego 219
M. Montewka, A. Skrzek, D. Plewik, S. Rudzki, A. Wysokiński, M. Kozioł-Montewka – Zakażenia miejsca operowanego – charakterystyka czynników ryzyka, endogennych źródeł zakażenia i metody zapobiegania 227

CONTENTS

J. Struzik, M. Niemiałtowski – Model studies on smallpox pathogenesis: the influence of vaccinia, mousepox and cowpox orthopoxviruses on the activation of transcription factor NF-κB 155
I. Stolarzewicz, A. Kapturowska, E. Białecka-Florjańczyk – Microbiological sources of colorants in food technology 167
D. Białoszewski, E. Bocian, S. Tyski – Ozonotherapy and application of ozone as disinfectant ... 177
M. Popiel, E. Wietrak, T. Laskus – Herpes simplex encephalitis (HSE) 185
A. Żuk-Wasek – Characterization of Epstein-Barr virus proteins – their participation in latency and relation to oncogenesis 191

XXVII CONGRESS OF THE POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS
5–8 september 2012, Lublin

E. A. Trafny – How to gain and use knowledge about multi-species biofilms? 205
E. Mazur – Microbiological diagnosis of acute upper respiratory tract infections: choise of specimens, interpretation problems due to the presence of normal nasopharyngeal flora and carrier state 213
D. Strzelec-Nowak, A. Bogut, J. Niedźwiadek, M. Kozioł-Montewka, A. Sikora – Microbiological diagnostics of prosthetic hip joint infections 219
M. Montewka, A. Skrzek, D. Plewik, S. Rudzki, A. Wysokiński, M. Kozioł-Montewka – Surgical site infections-characterization of risk factors, endogenous sources of infection and methods of prevention 227

ERRATA

W zeszycie 2/2012 w pracy M. Staniszewska, M. Bondaryk, K. Siennicka, J. Piłat, M. Schaller, W. Kurzątkowski "Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. substrate specificity of Aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis" umieszczono na str. 131 niewłaściwą tabelę.

Powinno być:

Table I

Expression of secreted aspartyl proteinases in artificial models

Model	Infection	Secreted aspartyl proteinases	Assay	Main findings	References
Human	Buccal mucosa	Sap	Immuno-SEM and Western blot with antibody--peroxidase conjugated	Proteinase antigens detected on the surface of adherent blastoconidia and hyphae	[13]
RHE	Oral infections	Sap1-3 and Sap4-6; *SAP*1-3 and *SAP*4-6;	Immunoelectron microscopy with polyclonal rabbit antibodies; RT-PCR; light microscopy	Large amounts of Sap1-3 antigens were found within yeast and hyphal cell wall; lower quantities of Sap4-6 were detected in hyphal cells; upregulation of *SAP*8 and *SAP*2 was observed in null mutants *Δsap1*, Δsap1/3; Sap1-3 but not Sap4-6 contribute to tissue damage of oral candidiasis	[86]
RHE	Cutaneous candidiasis	Sap1-3 and Sap4-6; *SAP*1-3 or *SAP*4-6	Immunoelectron microscopy with polyclonal antibodies; RT-PCR; light microscopy	Predominant expression of Sap1-3 within the cell wall of yeast; *SAP*1 and *SAP*2 detected during initial invasion of epidermal infection; yeast to hyphal transition accompanied by *SAP*6 expression during penetration of stratum granulosum, the corneal layer was accompanied by *SAP*8	[88]
RHE	Vaginal candidiasis	Sap1-10; *SAP*1-10	Immunoelectron microscopy with polyclonal rabbit antibodies; RT-PCR; light microscopy; LDH activity	Immune reactivity to Sap1 and Sap3 was detected in the cell wall, Sap4 to Sap6 were detected at lower intensity; expression of *SAP*3 is not essential for tissue damage of vaginal epithelia; crucial role of Sap1 and Sap2 in vaginal infections	[91]
RHE	Human oral and vaginal candidiasis	*SAP*1-3 and *SAP*4-6	RT-PCR, light microscopy; LDH activity	*SAP*5 was significantly upregulated as infection progressed in RHE models; *SAP*9 was the most highly expressed	[77]
RHE	Human oral and vaginal candidiasis	*SAP*1-3 and *SAP*4-6	Southern hybridization, light microscopy, LDH activity	Only *SAP*5 was detectably activated in this *in vitro* model	[67]
Caco2 and TR-146	Human oral and intestinal candidiasis	Sap1-3 Sap4-6	Immunofluorescence, light and scanning electron microscopy, LDH activity	Sap1-6 support invasion of *C. albicans* into oral and intestinal epithelial cells	[40]
THP-1	Human epithelium	Sap9-10	Western blot, fluorescence microscopy	Sap9 and Sap10 have no major impact on the phagocytosis and killing of *C. albicans* by human macrophages; Sap9 and Sap10 influence distinct cell wall functions by proteolytic cleavage of cell wall proteins	[94]