

WYSTĘPOWANIE I CHOROBOTWÓRCZOŚĆ DLA CZŁOWIEKA POTENCJALNIE TOKSYNOTWÓRCZYCH MACZUGOWCÓW – *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* I *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

Aleksandra Anna Zasada^{1*}

¹Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii,
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

1. Charakterystyka rodzaju. 2. Występowanie w środowisku. 3. Zakażenia człowieka. 4. Czynniki zjadliwości. 4.1. Toksyna błonicza. 4.2. Inne czynniki zjadliwości. 4.2.1. Czynniki adhezji. 4.2.2. Pobieranie żelaza. 4.2.3. Fosfolipaza D (PlD). 4.2.4. Proteazy serynowe. 4.2.5. Neuraminidaza H (NanH). 5. Podsumowanie

The occurrence and pathogenicity of potentially toxinogenic corynebacteria – *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Abstract: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* are closely related species possessing the ability to produce the lethal diphtheria toxin. The toxin is considered as the main virulence factor, but these species express also other virulence factors so nontoxigenic strains of the species are also able to cause serious infections. The interest in the virulence factors other than diphtheria toxin has been increasing and new factors and virulence mechanisms have been investigated. This paper is an overview of *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* infections in humans, presenting the mechanism of action of diphtheria toxin adhesive factors, iron uptake systems and other putative virulence factors.

1. Description of the genus. 2. Occurrence in the environment. 3. Human infections. 4. Virulence factors. 4.1. Diphtheria toxin. 4.2. Other virulence factors. 4.2.1. Adhesive factors. 4.2.2. Iron utilization. 4.2.3. Phospholipase D (PlD). 4.2.4. Serine proteases. 4.2.5. Neuraminidase H (NanH). 5. Summary

Słowa kluczowe: *C. diphtheriae*, chorobotwórczość, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, czynniki zjadliwości

Key words: *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, pathogenicity, virulence factors

1. Charakterystyka rodzaju

Do rodzaju *Corynebacterium* należą Gram-dodatnie bakterie, których komórki są pleiomorficzne, zwykle o kształcie prostych lub lekko zakrzywionych pałeczek o zwężonych końcach. W komórce obecne są ziarna metachromatyczne. Bakterie należące do tego rodzaju są fakultatywnymi anaerobami lub aerobami. Należą do chemoorganotrofów. Są katalazododatnie, nie wytwarzają przetrwalników i nie wykazują zdolności ruchu [38].

Obecnie rodzaj *Corynebacterium* obejmuje ponad 80 gatunków. Jak dotychczas tylko trzy z nich posiadają zdolność wytwarzania toksyny letalnej, zwanej toksyną błoniczą. Są to *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*. Gatunki te są ze sobą blisko spokrewnione. Mają podobną morfologię, skład ściany komórkowej, jak również podobną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA. Wszystkie te trzy gatunki różnią się od pozostałych przedstawicieli rodzaju *Corynebacterium* obecnością w komórce dużej ilości kwasów tłuszcz-

czowych, wytwarzaniem cystynazy i nie wytwarzaniem pyrazynamidazy [43].

C. ulcerans i *C. pseudotuberculosis* mogą być odróżnione od *C. diphtheriae* na podstawie takich cech biochemicznych jak wytwarzanie ureazy czy dodatni wynik odwrotnego testu CAMP. *C. ulcerans* od *C. pseudotuberculosis* odróżnia zdolność fermentacji glikogenu, skrobii i trehalozy (Tabela I) [24].

Na podstawie morfologii kolonii oraz właściwości biochemicznych *C. diphtheriae* można podzielić na cztery biotypy: *gravis*, *mitis*, *intermedius* i *belfanti*. Na podłożu tellurynowym Hoyle'a biotypy *mitis* i *belfanti* tworzą szare lub czarne, nieprzezroczyste kolonie wielkości 1,5–2 mm, gładkich brzegach i gładkiej, błyszczącej powierzchni. Często obserwowana jest zmienność w wielkości kolonii. Biotyp *gravis* tworzy matowe, nieprzezroczyste szare lub czarne kolonie o wielkości 1,5–2 mm, kruche, mające tendencje do rozpadania się na mniejsze fragmenty po dotknięciu eżą. Kolonie biotypu *intermedius* są małe, o wielkości 0,5–1 mm, szare lub czarne, półprzezroczyste, o błyszczącej powierzchni.

¹ Publikacja sfinansowana z darowizny BNP Paribas

* Autor korespondencyjny: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: azasada@pzh.gov.pl

Cechy różnicujące potencjalnie toksynotwórcze gatunki *Corynebacterium* [10, 24, 38]

Gatunek	Odwrotny CAMP	Wytwarzanie					Rozkład				
		Alkalicznej fifsfatazy	Ureazy	Ram- nozy	Sacha- rozy	Trecha- lozy	Sali- cyny	Skrobiy	Dex- tranu	Gliko- genu	Azo- tanów
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>gravis</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>mitis</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>intermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>belfanti</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>C. ulcerans</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-

Na podłożu agarowym z krwią kolonie biotypów *mitis*, *intermedius* i *belfanti* wytwarzają małą strefę β -hemolizy, natomiast biotyp *gravis* jest zazwyczaj niehemolizujący. Swoiste cechy biochemiczne wszystkich czterech biotypów przedstawiono w tabeli I.

2. Występowanie w środowisku

Drobnoustroje należące do rodzaju *Corynebacterium* występują powszechnie w środowisku – w glebie, na roślinach, na skórze i błonach śluzowych ludzi i zwierząt. Mogą również przetrwać przez długi czas na różnego rodzaju przedmiotach.

C. ulcerans jest mikroorganizmem komensalnym zwierząt. Był izolowany z dzikich i domowych zwierząt, takich jak psy, koty, konie, kozy, krowy, świnię, wielbłądy, małpy, wiewiórki i wydry [63, 67]. Zwierzęta mogą stanowić rezerwar dla zakażeń człowieka. Co więcej, drobnoustrój ten może wywoływać zapalenie wymienia u bydła i kóz. Znacząca liczba zakażeń człowieka *C. ulcerans* jest związana ze spożyciem niepasteryzowanych produktów mlecznych. Jest to związane z faktem, że w przypadkach zapalenia wymienia u bydła bakterie są obecne w mleku. Do zakażenia może dojść także podczas pracy przy zakażonych zwierzętach i obróbce ich produktów. Ostatnio również kontakt ze zwierzętami domowymi, takimi jak psy czy koty, został uznany za źródło zakażenia tym drobnoustrojem [14, 17, 25, 30, 40, 46, 67].

C. pseudotuberculosis rzadko powoduje zoonozy. Najczęściej tym drobnoustrojem zakażone są owce i kozy, rzadziej konie, bydło czy jelenie. Podobnie jak w przypadku *C. ulcerans*, źródłem infekcji dla ludzi mogą być niepasteryzowane produkty mleczne. Ryzyko zakażenia związane jest również z pracami przy zakażonych zwierzętach oraz obróbce ich produktów np. w rzeźnictwie [6].

Dotychczas uważano, że *C. diphtheriae* nie jest patogenem odzwierzęcym. Jednakże ostatnie doniesienia o koniach jako nosicielach *C. diphtheriae* wskazują na możliwe pojawienie się nowego źródła zakażeń człowieka

[31, 47]. *C. diphtheriae* izolowano również od kotów i psów [29]. Także w starszych publikacjach pojawiały się doniesienia o izolacji tego drobnoustroju od zwierząt [42, 56]. Bakterie tego gatunku sporadycznie wywołują zapalenie wymienia u bydła oraz są związane z zapaleniem skóry i gorączką u tych zwierząt. Przypuszcza się, że do zakażenia zwierząt dochodzi w wyniku kontaktu z zakażonymi pracownikami gospodarstwa [31].

3. Zakażenia człowieka

C. diphtheriae, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* wytwarzające toksynę błoniczą powodują chorobę zwaną błonicą, w przebiegu której bakterie kolonizują ograniczony obszar – najczęściej błony śluzowe gardła i nosa, rzadziej spojówki, błony śluzowe narządów płciowych czy uszkodzoną skórę – natomiast wytwarzana przez nie toksyna dostaje się do krwiobiegu i rozprzestrzenia się po całym organizmie powodując uszkodzenia głównie w mięśniu sercowym i układzie nerwowym [45].

Najczęściej błonica powodowana jest przez *C. diphtheriae*. Największa w ostatnim czasie w Europie epidemia miała miejsce w krajach byłego ZSRR w latach 90. ubiegłego wieku. W szczyście epidemii w 1995 roku odnotowano tam 50425 przypadków [13]. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2007 roku na całym świecie odnotowano 4190 przypadków błonicy wywołanej przez *C. diphtheriae*. Natomiast na terenie Unii Europejskiej w 2008 roku zgłoszonych zostało 47 przypadków błonicy wywołanej przez *C. diphtheriae* i *C. ulcerans*, które odnotowano na Łotwie – 29 przypadków, w Wielkiej Brytanii – 6, we Francji – 5, na Litwie – 2 oraz w Szwecji – 1 przypadek [20]. W roku 2009 w krajach UE zgłoszono 16 przypadków błonicy: 4 w Niemczech, 1 we Francji, 6 na Łotwie, 1 w Szwecji oraz 4 przypadki w Wielkiej Brytanii [21].

Zwraca uwagę obserwowany w ostatnim czasie w wielu krajach znaczący wzrost liczby zakażeń inwazyjnych powodowanych przez *C. diphtheriae*, przy czym najczęściej przez szczepy nietoksynotwórcze. Pomiędzy

rokiem 1893 a 1995, a więc w okresie ponad 100 lat, odnotowano tylko 58 przypadków bakteriemii spowodowanych przez ten drobnoustrój [57]. W latach 90. sytuacja ta zaczęła się zmieniać. W okresie 1999–2003 w Kanadzie odnotowano 13 przypadków zakażeń inwazyjnych *C. diphtheriae* [15]. Czternaście szczepów *C. diphtheriae* wyizolowano z zakażeń inwazyjnych w Szwajcarii w latach 1990–1996 [28]. W Polsce pierwszy przypadek zakażenia inwazyjnego *C. diphtheriae* odnotowano w 2004 roku, a w okresie 2005–2011 piętnaście kolejnych przypadków [23, 73]. Również w Brazylii zaobserwowano w ostatnim czasie wzrost liczby izolatów *C. diphtheriae* pochodzących z zakażeń inwazyjnych [33, 51]. Zakażenia inwazyjne powodowane są zarówno przez szczepy wytwarzające toksynę błoniczą, jak też nietoksynotwórcze. Czynniki predysponującymi takiego zakażenia są: bezdomność, przyjmowanie narkotyków drogą dożylną, alkoholizm, cukrzyca, homoseksualizm. Zakażeniom tym częściej ulegają mężczyźni niż kobiety [73].

Dane epidemiologiczne pokazują, że w wielu krajach rozwiniętych nastąpił również wzrost liczby zakażeń powodowanych przez toksynotwórcze szczepy *C. ulcerans*. Wydaje się, że zakażenia toksynotwórczymi *C. ulcerans* zastępują zakażenia toksynotwórczymi *C. diphtheriae*. W Wielkiej Brytanii w latach 2000–2009 wyizolowano 43 szczepy toksynotwórczych maczugowców, z których 27 (63%) stanowiły *C. ulcerans* [66]. We Francji w latach 2002–2008 wyizolowano 12 (63%) szczepów *C. ulcerans* z 19 przypadków zakażeń ludzi toksynotwórczymi maczugowcami [5]. Z kolei w Stanach Zjednoczonych w latach 1999–2005 w dwóch (29%) z 7 zakażeń wywołanych przez toksynotwórcze gatunki *Corynebacterium* wyizolowano *C. ulcerans*, natomiast przed 1999 rokiem ostatni odnotowany przypadek zakażenia toksynotwórczym *C. ulcerans* miał tam miejsce w 1996 roku. Również w Japonii odnotowano dwa przypadki zakażeń toksynotwórczymi *C. ulcerans* u ludzi w roku 2001 i 2002 [41].

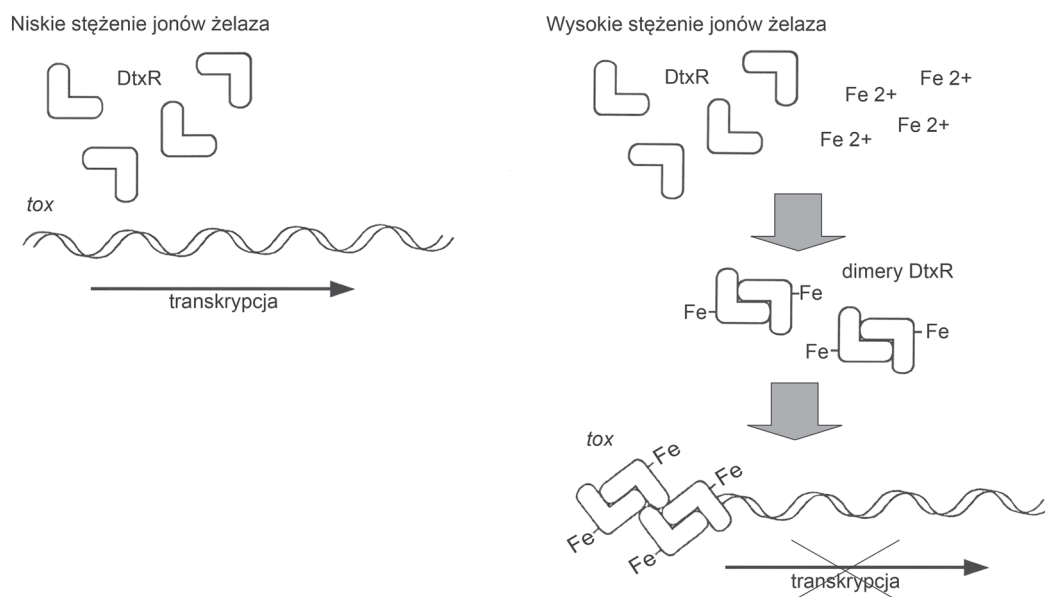
Epidemiologia zakażeń człowieka powodowanych przez *C. ulcerans* nie jest dobrze poznana. Jak wcześniej wspomniano, do zakażenia dochodzi zwykle przez kontakt ze zwierzętami lub poprzez spożycie niepasteryzowanych produktów mlecznych. Jednakże tego typu czynniki ryzyka nie zostały zidentyfikowane w niektórych przypadkach klasycznej błonicy powodowanej przez *C. ulcerans*, co sugeruje inne drogi zakażenia. Uważa się, że zakażenie człowiek-człowiek występuje rzadko [35]. Wydaje się, że grupę ryzyka zakażenia *C. ulcerans* stanowią kobiety, szczególnie powyżej 50 roku życia. Prawdopodobnie jest to związane z ich częstszym kontaktem ze zwierzętami domowymi (np. koty), a także z faktem, że – jak wykazały przeprowadzone w Europie badania – kobiety powyżej 40 roku życia mają niższy poziom przeciwciał przeciwbłoniczych niż mężczyźni [19, 42].

Natomiast niewiele informacji dotyczących *C. pseudotuberculosis* jest dostępnych w piśmiennictwie. Jak dotychczas zostało opisanych mniej niż 30 przypadków zakażeń ludzi tym drobnoustrojem. W opisanych przypadkach do zakażenia doszło przez kontakt z kozami i owcami [42, 58]. Szczepy toksynotwórcze *C. pseudotuberculosis* zwykle wywołują zakażenia podobne do błonicy. Wśród 25 krajów europejskich biorących udział w sieci monitorowania błonicy (Diphtheria Surveillance Network) tylko trzy przypadki zakażeń toksynotwórczymi *C. pseudotuberculosis* zostały odnotowane w latach 2000–2010 – dwa we Francji w 2004 i 2005 roku i jeden w Wielkiej Brytanii w 2008 roku [18]. Większość opisanych zakażeń ludzi nietoksynotwórczymi *C. pseudotuberculosis* miała postać zapalenia węzłów chłonnych [37, 58], z wyjątkiem jednego przypadku eozynochłonnego zapalenia płuc [39] i jednego przypadku zakażenia oka [48].

4. Czynniki zjadliwości

4.1. Toksyna błonicza

Toksyna błonicza jest uznawana za główny czynnik wirulencji *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*. Jest kodowana przez gen *tox*, obecny w materiale genetycznym blisko ze sobą spokrewnionych corynebakteriofagów. Jak dotychczas najlepiej poznany ich przedstawicielem jest fag β . Fagi należące do tej grupy mają zdolność wbudowywania swojego DNA w chromosom *Corynebacterium* podczas fazy lizogenicznej cyklu infekcyjnego. Integracja może nastąpić w dwóch specyficznych miejscach: *attB1* i *attB2*. Ekspresja genu *tox* w szczepach lizogennych jest regulowana przez białko DtxR w odpowiedzi na zmianę poziomu Fe^{2+} . DtxR jest globalnym regulatorem kodowanym przez chromosomalny gen *dtxR*. Białko to reguluje ekspresję wielu genów związanych z metabolizmem żelaza, ochroną przed stresem oksydacyjnym, a także patogenezą [27, 55]. Przy braku Fe^{2+} apo-DtxR występuje w postaci nieaktywnego monomeru, który w niewielkiej części tworzy niestabilne formy dimeryczne. Natomiast po aktywacji przez Fe^{2+} DtxR tworzy stabilne dimery, których dwie pary przyłączają się po przeciwnych stronach do sekwencji operatora genu *tox*. Białko DtxR składa się z dwóch głównych domen strukturalnych połączonych elastycznym regionem bogatym w prolinę. Domena N-terminalna zawiera podstawowe i dodatkowe miejsca wiązania jonów metali, fragment rozpoznający strukturę helix-turn-helix DNA oraz znaczną powierzchnię hydrofobową niezbędną do utworzenia stabilnego dimeru [49]. Po przyłączeniu się dimerów DtxR do promotora *tox* transkrypcja genu *tox* jest hamowana. Kiedy dostępność wolnych jonów żelaza jest ograniczona – jak

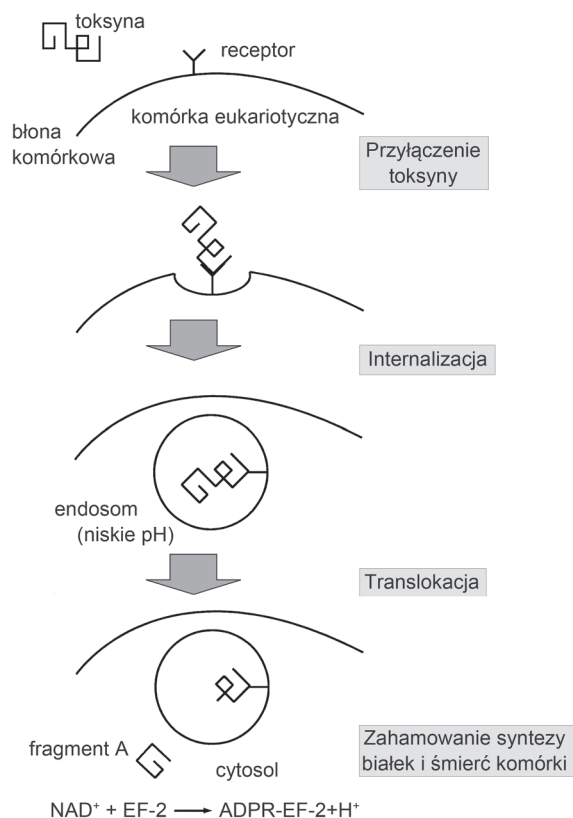


Rys. 1. Regulacja ekspresji toksyny błoniczej. Opis w tekście

to ma miejsce w organizmie człowieka i zwierząt gdzie żelazo występuje głównie w postaci związanej z białkami – nie tworzące stabilnych kompleksów DtxR nie jest w stanie przyłączyć się do DNA, co prowadzi do indukcji wytwarzania toksyny błoniczej (Rys. 1).

Toksyna błonicza składa się z trzech domen: domeny katalitycznej, domeny transbłonowej i domeny wiążącej receptor. N-terminalna domena katalityczna o aktywności ADP-rybozylotransferazy określana jest jako

fragment A, natomiast domeny transbłonowa i wiążąca receptor są razem określane jako fragment B. Fragment A z fragmentem B jest połączony mostkiem dwusiarczkowym. Domena transmembranowa umożliwia przetransportowanie domeny katalitycznej przez błonę komórki eukariotycznej. Domena wiążąca receptor przyłącza się do receptora na powierzchni komórki eukariotycznej [9]. Intoksykacja pojedynczej komórki eukariotycznej została schematycznie przedstawiona na Rys. 2. W pierwszym etapie toksyna wiąże się do receptora na powierzchni komórki poprzez domenę wiążącą receptor (fragment B). Następnie utworzony kompleks ulega internalizacji na drodze endocytozy za pośrednictwem receptora. W odpowiedzi na niskie pH w powstałym endosomie następuje zmiana konformacji fragmentów A i B toksyny, co prowadzi do ekspozycji domeny hydrofobowej i zwiększenia powinowactwa do cząsteczek lipidów błonowych. W następnym etapie domena transmembranowa jest wbudowywana w błonę i fragment A toksyny ulega translokacji przez błonę do cytosolu. Mostek dwusiarczkowy łączący fragment A i B ulega redukcji. Końcowym etapem translokacji jest uwolnienie fragmentu A do cytosolu, gdzie ulega on ponownemu zwinieniu. Katalityczna domena toksyny (fragment A) hamuje syntezę białek poprzez inaktywację czynnika elongacyjnego 2 (EF-2) przez jego ADP-rybozylację. Wynikiem jest śmierć komórki [2, 22].



Rys. 2. Model działania toksyny błoniczej. Opis w tekście

4.2. Inne czynniki zjadliwości

Mechanizm wytwarzania toksyny błoniczej przez toksynotwórcze maczugowce został dobrze poznany, ale niewiele wiadomo o innych czynnikach wirulencji kluczowych dla kolonizacji gospodarza, wnikania i uni-

kania działania systemu immunologicznego. Bakteryjne czynniki, które umożliwiają odróżnienie szczepów epidemicznych od endemicznych nie zostały dotychczas zidentyfikowane. Fakt, że pewne epidemiczne klony są odpowiedzialne za epidemie błonicy z tysiącami zgonów w krajach rozwiniętych wskazuje, że bakteryjne czynniki wirulencji, inne niż toksyna błonicza, są ważne dla wywołania choroby u ludzi. Co więcej, wzrastająca liczba przypadków chorób inwazyjnych, takich jak zapalenie wsierdza, bakteremia, zapalenie płuc, zapalenie szpiku, ropień śledziony, septyczne zapalenie stawów, spowodowanych przez nietoksynotwórcze klony *C. diphtheriae* również wskazuje na ważną rolę innych czynników wirulencji w przebiegu zakażenia [15, 28, 33, 74]. Publikowane w ostatnich dwóch latach wyniki analiz całych genomów *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* pokazują obecność wielu genów kodujących przypuszczalne czynniki zjadliwości [52, 60, 69, 70]. Jednak ich funkcja nie została jeszcze udowodniona. Poniżej przedstawiono wybrane czynniki zjadliwości, których funkcja została zbadana u tych trzech gatunków drobnoustrojów.

4.2.1. Czynniki adhezji

Przeprowadzone na liniach komórkowych badania mechanizmów przylegania, wnikania i wewnątrzkomórkowego przeżywania przeprowadzone na szczepach *C. diphtheriae* wykazały, że drobnoustroje te mają zdolność przylegania nie tylko do komórek nabłonkowych krtani (Hep-2) czy gardła (Detroit 562), ale także wnikania do tych komórek i przeżywania w nich [3, 32]. Podczas gdy receptory komórkowe gospodarza i białka związane z wnikaniem patogenu wciąż nie są znane, bakteryjne czynniki adhezji zostały ostatnio przynajmniej częściowo scharakteryzowane na poziomie molekularnym. Dotychczas opisano trzy różne typy pili u *C. diphtheriae* określone jako pili typu SpaA, SpaD i SpaH [26, 64, 68]. Geny związane z wytwarzaniem pili kodują dziewięć białek pili, oznaczonych kolejnymi literami alfabetu od SpaA do SpaI (Spa – sortase-mediated pilus assembly), oraz sześć sortaz oznaczonych od SrtA do SrtF. Pili każdego typu zbudowane są z trzech białek: głównej podjednostki piliny tworzącej trzon pili oraz dwóch pomniejszych podjednostek umiejscowionych u podstawy i na końcu pili [59]. Trzon pili typu SpaA zbudowany jest z polimerów białka SpaA, u podstawy pili oraz na całej jej długości znajduje się białko SpaB, a na końcu pili zlokalizowane jest białko SpaC. Podobnie, pili typu SpaD zbudowane są z białek SpaD, SpaE i SpaF, a pili typu SpaH budują białka SpaH, SpaI i SpaG. Za polimeryzację odpowiednich białek w strukturę pilusa odpowiadają sortazy. Geny pięciu z sześciu opisanych u *C. diphtheriae* sortaz są zgrupowane razem z genami białek pili, w których składaniu uczestniczą

– StrA z genami pili typu SpaA, SrtB/SrtC z genami pili typu SpaD i SrtD/SrtE z genami pili typu SpaH. Natomiast sortaza SrtF zlokalizowana jest oddzielnie w genomie [26, 64, 68].

Geny kodujące pili typu SpaA i SpaD zidentyfikowano również u *C. pseudotuberculosis* [70]. Natomiast w genomie *C. ulcerans* wykryto obecność dwóch grup genów odpowiedzialnych za wytwarzanie pili. Pierwsza z nich jest podobna do grupy genów kodujących pili typu SpaD u *C. diphtheriae*. Druga natomiast zawiera geny *spaB* i *spaC* oraz gen sortazy *strA*. W odróżnieniu od grupy genów kodujących pili typu SpaA u *C. diphtheriae*, brak jest tu genu kodującego białko SpaA stanowiące u *C. diphtheriae* trzon pili. Przypuszcza się, że główna podjednostka budująca te pili może być zastępowana przez białko SpaD [69]. Z drugiej jednak strony badania przeprowadzone dla szczepu NCTC 13129 *C. diphtheriae* pokazały, że pili są składane niezależnie i morfologicznie różnią się od siebie [26, 64, 68], co sugeruje że zamiana głównej podjednostki pili u *C. ulcerans* jest mało prawdopodobna. Bardziej prawdopodobne wydaje się, że białka SpaB i SpaC tworzą dimery SpaB-SpaB i SpaC-SpaC związane kowalencyjnie z powierzchnią komórki *C. ulcerans* i, z powodu braku trzonu pili, umożliwiają bliższy kontakt z tkankami gospodarza [8, 69].

Kontynuując badania właściwości pili Ma nd l i k i wsp. [50] wykorzystali mutanty *C. diphtheriae* defektywne w wytwarzaniu poszczególnych typów pili w celu porównania ich zdolności przylegania do komórek nabłonkowych gardła, płuc i krtani. Wykazali oni, że specyficzne pili biorą udział w adhezji do wszystkich badanych typów komórek gospodarza, jednak z różną wydajnością przylegania do poszczególnych typów komórek. Co więcej, oprócz podjednostek pili również obecność innych białek ma udział w adhezji do nabłonkowych komórek krtani, gardła i płuc, ponieważ całkowita utrata zdolności do przylegania na skutek mutagenyzy genów kodujących pili i sortazę nie była obserwowana. K o l o m b o i wsp. [11] opisali udział w przyleganiu *C. diphtheriae* do erytrocytów białek powierzchniowych 67p i 72p nie tworzących pili. Prawdopodobnie znaczenie w adhezji *C. diphtheriae* do komórek eukariotycznych mają także hemaglutyniny, eksponowane na powierzchni komórki bakteryjnej polisacharydy i reszty cukrowe (mannoza, galaktoza, N-acetylogalaktozamina, N-acetyloglukozamina), hydrofobiny i trans-sjalidazy [52]. Można powiedzieć, że adhezja jest mechanizmem wieloczynnikowym. Istnienie kilku różnych czynników adhezji i różnych receptorów na powierzchni komórek gospodarza potwierdzają dodatkowo zaobserwowane trzy różne formy przylegania *C. diphtheriae* do komórek nabłonkowych krtani Hep-2: agregacyjny, zlokalizowany (miejscowy) i dyfuzyjny [33, 34]. Oprócz obecności adhezyn na przyleganie ma również wpływ dostępność

czynników wzrostowych, na przykład dodanie do podłoża żelaza wpływa na zdolność hemaglutynacji i wiązania pektyny [12]. Zdolność hemaglutynacji jest uznawana za wskaźnik zdolności *C. diphtheriae* do przylegania do błony komórkowej komórek eukariotycznych [52].

4.2.2. Pobieranie żelaza

Żelazo jest jednym z kluczowych składników niezbędnych do wzrostu większości bakterii. W organizmach zwierząt i ludzi żelazo występuje w postaci związanej z białkami, takimi jak transferyna, laktoferyna, ferrytyna lub w postaci kompleksów jak hemina czy hemoglobina. Dlatego też większość bakterii patogennych rozwinęło systemy pozyskiwania żelaza z tkanek gospodarza. Jeden z systemów pozyskiwania żelaza jest związany z wytwarzaniem sideroforów – drobnocząsteczkowych związków chemicznych chelatujących jony żelaza [72]. *C. diphtheriae* wytwarza siderofor określany jako corynebaktyna [61]. Jego działanie związane jest z grupą genów *ciuABCDEFG*, gdzie *ciuA-D* tworzą operon, którego produkt jest podobny do systemu transportu typu ABC, *ciuE* jest wymagany do syntezy sideroforu, produkt *ciuF* wykazuje podobieństwo do białek błonowych efflux bakterii Gram-dodatnich, natomiast produkt genu *ciuG* nie wykazuje podobieństwa do żadnego znanego białka [44]. Operon *ciuABCDE* został również wykryty u *C. pseudotuberculosis* [60, 70]. Ponadto u tego gatunku wykryto drugi zestaw genów systemu transportu typu ABC – geny *fagA*, *fagB*, *fagC* i *fagD* – również związany z pobieraniem żelaza w środowisku o ograniczonym jego dostępie [4, 60].

C. diphtheriae, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* wytworzyły również systemy pozyskiwania żelaza z hemu i heminy, kodowane przez geny *hmuT*, *hmuU*, *hmuV* i *hmuO*, z których pierwsze trzy tworzą operon. Operon *hmuTUV* także koduje system transportu typu ABC, natomiast *hmuO* koduje oksygenazę hemu, która katalizuje degradację wewnątrzkomórkowego hemu i tym samym uwolnienie żelaza [62, 70]. Allen i Schmitt [1] wykazali udział w pozyskiwaniu żelaza z hemu i heminy dodatkowych genów *htaA* i *htaB*. Zaproponowali oni model, zgodnie z którym hemina wiąże się z HtaA, a następnie za pośrednictwem HtaB jest przenoszona na HmuT. HmuT dostarcza heminę do permeazy HmuU, będącej składnikiem systemu transportu typu ABC, co umożliwia pobranie heminy do cytosolu komórki bakteryjnej. W cytosolu na skutek degradacji heminy przez enzym HmuO zostają uwolnione jony żelaza [1].

4.2.3. Fosfolipaza D (Pld)

Fosfolipaza D kodowana przez gen *pld* jest enzymem degradującym sfingomielinę. Uznawana jest za główny czynnik wirulencji *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*.

Umożliwia przeżywanie i rozprzestrzenianie się bakterii w tkankach gospodarza [53, 69]. Enzym Pld o podobnej sekwencji aminokwasowej wśród bakterii wytwarzają tylko wspomniane wyżej dwa gatunki oraz *Arcanobacterium haemolyticum* [54]. Co ciekawe, podobny enzym jest wytwarzany jako egzotoksyna przez pająki z rodzaju *Loxosceles* [71]. Wykazano, że zarówno enzym bakteryjny, jak też wytwarzany przez pająki, charakteryzuje podobny efekt patofizjologiczny obejmujący agregację płytek krwi, nadprzepuszczalność śródbłonkową, hemolizę zależną od dopełniacza oraz neutrofilozależną martwicę skóry [17].

4.2.4. Proteazy serynowe

Proteazy serynowe są sekrecyjnymi enzymami hydrolizującymi wiązania peptydowe. Uczestniczą w patogenezie zakażeń poprzez modulację swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza oraz destrukcję tkanek gospodarza. W genomie *C. ulcerans* stwierdzono obecność dwóch genów – *tspA* i *vsp1* – kodujących te enzymy. Dodatkowo w szczepie wyizolowanym od pacjenta stwierdzono obecność trzeciego genu kodującego protezę serynową oznaczonego jako *vsp2*. Obecność dodatkowego genu kodującego tego typu enzym może sugerować, że szczep wytwarza więcej proteaz serynowych niż szczepy nie posiadające dodatkowego genu, może pomagać w interakcji patogen-gospodarz oraz w przeżywaniu bakterii w niekorzystnym środowisku [69]. Analiza genomu *C. pseudotuberculosis* również wykazała obecność genów kodujących proteazy serynowe [70].

4.2.5. Neuraminidaza H (NanH)

Neuraminidazy stanowią grupę hydrolaz glikozylowych, które katalizują usuwanie końcowych kwasów sjałowych z różnych glikokoniugatów i wykazują duże powinowactwo do reszt kwasu sjałowego związanego z resztami cukrowymi polisacharydów eksponowanych na powierzchni komórki gospodarza. Enzymy te biorą udział w modyfikowaniu zdolności komórek gospodarza do odpowiedzi na zakażenie bakteryjne. Neuraminidazę wytwarzają zarówno *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, jak i *C. pseudotuberculosis* [52, 69, 70].

5. Podsumowanie

Wprowadzenie w latach 40. obowiązkowych szczepień przeciwbłoniczych w wielu krajach Europy pozwoliło na znaczące zmniejszenie liczby zachorowań na błonicę. Jednak ostatnie lata pokazują, że *C. ulcerans* i *C. diphtheriae* są powracającymi patogenami człowieka. Obserwowana zmienność genetyczna tych patogenów

prawdopodobnie umożliwia im zasiedlenie nowej niszy ekologicznej. Obecnie izolowane w krajach o wysokim odsetku zaszczepienia przeciw błonicy szczepu *C. diphtheriae* nie wytwarzają toksyny błoniczej, ale posiadają zdolność wnikania do tkanek i wywoływania zakażeń systemowych. Niegdyś sporadyczne, obecnie coraz częściej odnotowywane są także zakażenia ludzi *C. ulcerans*. Zmienność cech zjadliwości jest związana z obecnością licznych wysp patogenności w genomach *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*. Porównanie genomów dwóch szczepów *C. diphtheriae*: NCTC 13129 i C7(-) pokazało, że 11 z 13 wysp patogenności wykrytych w szczepie NCTC 13129 nie było obecnych w szczepie C7(-) [36]. Różnice w składzie genów stwierdzono również porównując szczep *C. ulcerans* izolowany z zapalenia płuc zakończonego zgonem pacjenta ze szczepem z wymazu z nosa psa nie wykazującego objawów chorobowych [69].

Wzrost zainteresowania badaczy czynnikami zjadliwości innymi niż toksyna błonicza u potencjalnie toksynotwórczych gatunków maczugowców pojawił się dopiero w ostatnich latach, dlatego wciąż jeszcze niewiele na ten temat wiadomo. Prowadzone analizy całych genomów pokazują istnienie wielu potencjalnych czynników zjadliwości, ale także licznych genów kodujących białka o nieznanym celu. Pełne poznanie czynników zjadliwości tych drobnoustrojów pozwoli na zrozumienie patogeny wywoływanych przez nie zakażeń.

Piśmiennictwo

- Allen C.E., Schmitt M.P.: HtaA is an iron-regulated heme binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **191**, 2638–2648 (2009)
- Bennett M.J., Eisenberg D.: Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1464–1475 (1994)
- Bertuccini L., Baldassarri L., von Hunolstein C.: Internalization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microbiol. Path.* **37**, 111–118 (2004)
- Billington S.J., Esmay P.A., Songer J.G., Jost H.: Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**, 41–45 (2002)
- Bonmarin I., Guiso N., Le Fleche-Mateos A., Patey O., Grimont P.A.D., Levy-Bruhl D.: Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, **27**, 4196–4200 (2009)
- Bregenzer T., Frei R., Ohnacker H., Zimmerli W.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clin. Microb. Infect.* **3**, 696–698 (1997)
- Centers for Disease Control and Prevention. Travelers' Health – Yellow Book. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/diphtheria.aspx> (24 lipca 2012)
- Chang C., Mandlik A., Das A., Ton-That H.: Cell surface display of minor pilin adhesins in the form of a simple heterodimeric assembly in *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* **79**, 1236–1247 (2011)
- Choe S., Bennett M.J., Fujii G., Curmi P.M., Kantardjieff K.A., Collier R.J., Eisenberg D.: The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, **357**, 216–222 (1992)
- Clarridge J.E., Spiegel C.A.: *Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella* (w) Manual of Clinical Microbiology, red. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H., ASM Press, Washington, D.C., 1995, s. 357.
- Colombo A.V., Hirata R.Jr., Rocha de Souza C.M., Monteiro-Leal L.H., Previato J.O., Formiga L.C.D., Andrade A.F.B., Mattos-Guaraldi A.L.: *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 235–239 (2001)
- de Oliveira Moreira L., Andrade A.F.B., Vale M.D., Souza S.M.S., Hirata R.Jr., Asad L.O.B., Asad N.R., Monteiro-Leal L.H., Previato J.O., Mattos-Guaraldi A.L.: Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5907–5913 (2003)
- De Zoysa A., Efstratiou A.: Eight International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and the Diphtheria Surveillance Network – June 2004: Progress is needed to sustain control of diphtheria in European Region. *Eurosurveill.* **9**, 489 (2004)
- De Zoysa A., Hawkey P.M., Engler K., George R., Mann G., Reilly W., Taylor D., Efstratiou A.: Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4377–4381 (2005)
- DeWinter L., Bernard K.A., Romney M.C.: Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3447–9 (2005)
- Dias A.A.S.O., A.L. Mattos-Guaraldi i wsp.: *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 743–748 (2010)
- Dias A.A.S.O., A.L. Mattos-Guaraldi i wsp.: Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. *Vet. Microbiol.* **153**, 323–331 (2011)
- DIPNET. Diphtheria Surveillance Network. Realtime Case Summary Information From EU Partners. http://www.dipnet.org/summary_analysis.secure.php (24 lipca 2012)
- Edmunds W.J., E. Miller i wsp.: The sero-epidemiology of diphtheria in Western Europe. *Epidemiol. Infect.* **125**, 113–125 (2000)
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2010.
- Falnes P.O., Sandvig K.: Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 407–413 (2000)
- Farfour E., Badell E., Zasada A., Hotzel H., Tomaso H., Guillot S., Guiso N.: Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 173–175 (2012)
- Funke G., vonGraevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 125–159 (1997)
- Galbraith N.S., Forbes P., Clifford C.: Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales 1951–80. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, **284**, 1761–1765 (1982)

26. Gaspar A.H., Ton-That H.: Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **188**, 1526–1533 (2006)
27. Groman N.B.: Conversion by corynephages and its role in the natural history of diphtheria. *J. Hyg. (Camb.)*, **93**, 405–417 (1984)
28. Gubler J., Huber-Schneider C., Gruner E., Altwegg M.: An outbreak of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1295–1298 (1998)
29. Hall A.J., M.L. Tondella i wsp.: Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 688–691 (2010)
30. Hart R.J.C.: *Corynebacterium ulcerans* in humans and cattle in North Devon. *J. Hyg. (Camb.)*, **92**, 161–164 (1984)
31. Henricson B., Segarra M., Garvin J., Burns J., Jenkins S., Kim C., Popovic T., Golaz A., Akey B.: Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* associated with an equine wound infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 253–257 (2000)
32. Hirata R. Jr., Napoleao F., Monteiro-Leal L.H., Andrade A.F.B., Nagao P.E., Formiga L.C.D., Fonseca L.S., Mattos-Guaraldi A.L.: Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 115–119 (2002)
33. Hirata R.Jr., Pereira G.A., Filardy A.A., Gomes D.L.R., Damasco P.V., Rosa A.C.P., Nagao P.E., Pimenta F.P., Mattos-Guaraldi A.L.: Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **41**, 986–991 (2008)
34. Hirata R.Jr., Souza S.M.S., Rocha de Souza C.M., Andrade A.F.B., Monteiro-Leal L.H., Formiga L.C.D., Mattos-Guaraldi A.L.: Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial. Path.* **36**, 125–130 (2004)
35. Hogg R.A., Wessels J., Hart J., Efstratiou A., De Zoysa A., Mann G., Allen T., Pritchard G.C.: Possible zoonotic transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from companion animals in a human case of fatal diphtheria. *Vet. Rec.* **165**, 691–692 (2009)
36. Iwaki M., Komiya T., Yamamoto A., Ishiwa A., Nagata N., Arakawa Y., Takahashi M.: *Corynebacterium diphtheriae* C7(–) and PW8 strains: Genome organization and pathogenicity. *Infect. Immun.* **78**, 3791–800 (2010)
37. Join-Lambert O.F., Ouache M., Canioni D., Beretti J.L., Blanche S., Berche P., Kayal S.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 848–851 (2006)
38. Jones D., Collins M.D.: Irregular, nonsporing Gram-positive rods (w) Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 2, red. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, s. 1261.
39. Keslin M.H., McCoy E.L., McCusker J.J., Lutch J.S.: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A new cause of infectious and eosinophilic pneumonia. *Am. J. Med.* **67**, 228–231 (1979)
40. Kisely S.R., Proce S., Ward T.: *Corynebacterium ulcerans*: a potential cause of diphtheria. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **4**, R63–R64 (1994)
41. Komiya T., Seto Y., De Zoysa A., Iwaki M., Hatanaka A., Tsunoda A., Arakawa Y., Kozaki S., Takahashi M.: Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. *J. Med. Microbiol.* **59**, 1497–1504 (2010)
42. Kwaszewska A., Anusz Z.: Appearance in domestic animals of *Corynebacterium diphtheriae* and other *Corynebacterium* strains pathogenic for man. *Przegl. Epidemiol.* **33**, 269–276 (1979)
43. Kraszewska A.K., Szewczyk E.M.: Postępy w taksonomii i metodach identyfikacji izolowanych od ludzi bakterii z rodzaju *Corynebacterium*. *Post. Mikrobiol.* **50**, 155–167 (2011)
44. Kunkle C.A., Schmitt M.P.: Analysis of a DtxR-regulated iron transport and siderophore biosynthesis gene cluster in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **187**, 422–433 (2005)
45. Kuszewski K.: Błonica (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze, red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A., alfa-medica Press, Bielsko-Biała, 2007, s. 40.
46. Lartigue M.-F., Monnet X., Le Fleche A., Grimont P.A.D., Benet J.-J., Durrbach A., Fabre M., Nordmann P.: *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 999–1001 (2005)
47. Leggett B.A., De Zoysa A., Abbott Y.E., Leonard N., Markey B., Efstratiou A.: Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse. *Vet. Rec.* **166**, 656–658 (2010)
48. Liu D.T., Chan W.M., Fan D.S., Lam D.S.: An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Br. J. Ophthalmol.* **89**, 245–246 (2005)
49. Love J.F., vanderSpek J.C., Marin V., Guerrero L., Logan T.M., Murphy J.R.: Genetic and biophysical studies of diphtheria toxin repressor (DtxR) and the hypereactive mutant DtxR(E175K) support a multistep model of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2506–2511 (2004)
50. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H.: *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **64**, 111–124 (2007)
51. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D., Pereira G.A.: Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microb. Infect.* **2**, 1507–1512 (2000)
52. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D.: Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from case of endocarditis. *Curr. Microbiol.* **37**, 156–158 (1998)
53. McKean S.C., Davies J.K., Moore R.J.: Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology*, **153**, 2203–2211 (2007)
54. McNamara P.J., Cuevas W.A., Songer J.G.: Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene*, **156**, 113–118 (1995)
55. Oram M., Woolston J.E., Jacobson A.D., Holmes R.K., Oram D.M.: Bacteriophage-base vectors for site-specific insertion of DNA in the chromosome of corynebacteria. *Gene*, **391**, 53–62 (2007)
56. Parish H.S., O'Kell C.C.: On the isolation of virulent diphtheria bacilli from wounds of horses. *Br. J. Exp. Pathol.* **7**, 173–174 (1926)
57. Patey O., C. Lafaix i wsp.: Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 441–445 (1997)
58. Peel M.M., Palmer G.G., Stacpoole A.M., Kerr T.G.: Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 185–191 (1997)

59. Rogers E.A., Das A., Ton-That H.: Adhesion by pathogenic corynebacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 91–103 (2011)
60. Ruiz J.C., V. Azevedo i wsp.: Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PlosONE*, **6**, e18551 (2011)
61. Russell L.M., Holmes R.K.: Highly toxigenic but avirulent Park-Williams 8 strain of *Corynebacterium diphtheriae* does not produce siderophore. *Infect. Immun.* **47**, 575–578 (1985)
62. Schmitt MP.: Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J. Bacteriol.* **179**, 838–845 (1997)
63. Schuegger R., Schoetner C., Długaiczek J., Lichtenfeld I., Trouillier A., Zeller-Peronnet V., Busch U., Berger A., Kugler R., Hormansdorfer S., Sing A.: Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1314–1315 (2009)
64. Swierczynski A., Ton-That H.: Type III pilus of corynebacteria: pilus length is determined by the level of its major pilin subunit. *J. Bacteriol.* **188**, 6318–6325 (2006)
65. Taylor D.J., Efstratiou A.: Diphtheria toxin production by *Corynebacterium ulcerans* from cats. *Vet. Rec.* **150**, 355 (2002)
66. Taylor J., Saveeda-Campos M., Harwood D., Pritchard G., Raphaely N., Kapadia S., Efstratiou A., White J., Balasegaram S.: Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in veterinary student in London, United Kingdom, May 2010. *Eurosurveill.* **15**, 19634 (2010)
67. Tiwari T.S.P., Golaz A., Yu D.T., Ehresmann K.R., Jones T.F., Hill H.E., Cassiday P.K., Pawlowski L.C., Moran J.S., Popovic T., Wharton M.: Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 395–401 (2008)
68. Ton-That H., Schneewind O.: Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* **50**, 1429–1438 (2003)
69. Trost E., A. Tauch i wsp.: Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics*, **12**, 383 (2011)
70. Trost E., Tauch A.: The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, **11**, 728 (2010)
71. van Meeteren L.A., Frederiks F., Giepmans B.N., Pedrosa M.F., Billington S.J., Jost B.H., Tambourgi D.V., Moolenaar W.H.: Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **279**, 10833–10836 (2004)
72. Zajdowicz S., Haller J.C., Krafft A.E., Hunsucker S.W., Mant C.T., Duncan M.W., Hodges R.S., Jones D.N.M., Holmes R.K.: Purification and structural characterization of siderophore (corynebactin) from *Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS ONE*, **7**, e34591 (2012)
73. Zasada A.A., Baczevska-Rej M., Wardak S.: An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e907–e912 (2010)
74. Zasada A.A., Baczevska-Rej M.: Typy szczepów *Corynebacterium diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004–2008. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 183–190 (2008)