

Kwartalnik

Tom 44

Zeszyt 3 • 2005

CODEN:

PMKMAV 44 (3)

2005

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), MIECZYŚLAW K. BŁASZCZYK (Uniwersytet Rzeszowski),
RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski), JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki),
DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka), EUGENIA GOSPODAREK (Akademia Medyczna w Bydgoszczy),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
MAREK JAKÓBISIAK (Akademia Medyczna w Warszawie), MIROSŁAW KAŃTOCH (Państwowy Zakład Higieny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki), BOHDAN STAROŚCIAK (Akademia Medyczna w Warszawie),
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

JERZY HREBENDA (redaktor naczelny), JACEK BIELECKI (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz)

Adresy redakcji

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (0 22) 554 13 05/304, fax (0 22) 554 14 04
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna
ul. Ocзки 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (0 22) 628 08 22, (0 22) 621 13 51

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ KOMITETU BADAŃ NAUKOWYCH

Index Copernicus 4,88 (2003); KBN PO5 4,0 (2004)
Pismo indeksowane w EMBASE/Excepta Medica

Na okładce: Komórki *Listeria monocytogenes* wewnątrz mysiej komórki makrofagopodobnej linii I774
(Olympus IX70, wzbudzenie FITC, 1500x), fot. Jarosław Wiśniewski

Projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

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 + 15 egz., Objętość 12 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk:

Zakład Wydawniczy *Letter Quality*, 01-216 Warszawa, Bryłowska 35/38,

OPORNOŚĆ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* NA PENICYLINĘ I INNE ANTYBIOTYKI β -LAKTAMOWE

Radosław Izdebski

Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, e-mail: radek@cls.edu.pl

Wpłynęło w styczniu 2005 r.

1. Wstęp. 2. Rozprzestrzenianie się oporności na penicylinę wśród *S. pneumoniae* na świecie. 3. Białka wiążące penicylinę – miejsca docelowe antybiotyków β -laktamowych u *S. pneumoniae*. 4. Mozaikowe geny *pbp*. 5. Klonalne rozprzestrzenianie się oporności na penicylinę. 6. Tolerancja *S. pneumoniae* wobec penicyliny. 7. Wysoki poziom oporności na antybiotyki β -laktamowe związany ze zmianami w operonie *murMN*. 8. Oporność na antybiotyki β -laktamowe związana ze zmianami w genach *ciaH* oraz *cpoA* u mutantów laboratoryjnych. 9. Immunoprofilaktyka. 10. Podsumowanie

Resistance to penicillin and other β -lactams in *Streptococcus pneumoniae*

Abstract: *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a common cause of pneumonia, bacteremia, meningitis, otitis media and sinusitis. Penicillin-resistant *S. pneumoniae* isolates were first detected in the 1960s and since then they have been isolated from patients in many parts of the world. The emergence and rapid spread of penicillin-resistant *S. pneumoniae* create a serious public health problem. Rates of penicillin-resistant *S. pneumoniae* are as high as 60% in some parts of Latin America and 80% in some countries in Asia. The 26 so-called international pneumococcal clones identified till now have significantly contributed to the rapid increase in resistance in pneumococci worldwide. Resistance to penicillin is due to the production of altered penicillin-binding proteins (PBPs) which have a decreased affinity for the antibiotic. Such PBP variants are encoded by genes of mosaic structure as a result of genetic exchange between pneumococci and related streptococcal species. PBP2x, PBP2b and PBP1a are primary resistance determinants, and their modification is an essential step in the development of high-level resistance. An alteration in MurM, an enzyme involved in the biosynthesis of branched-stem cell wall muropeptides, is additionally required for the maximum expression of resistance to penicillin and other β -lactams. Mutations in *ciaH* or *cpoA* genes confer increased resistance to β -lactam in cells that contain no alterations in PBP genes. The currently available vaccines are based on immunity to capsular polysaccharides of the pneumococcus of which more than 90 serotypes exist. The 23-valent polysaccharide vaccine, which is recommended for use in adults, contains capsular polysaccharides from the 23 capsular types of *S. pneumoniae*. For the immunization of children less than 2 years of age, a 7-valent conjugated polysaccharide vaccine is recommended.

1. Introduction. 2. The worldwide spread of penicillin resistance in *S. pneumoniae*. 3. Penicillin-binding proteins – the target of β -lactams in *S. pneumoniae*. 4. Mosaic genes *pbp*. 5. Clonal spread of penicillin resistance. 6. Penicillin tolerance in *S. pneumoniae*. 7. High-level β -lactam resistance mediated by alterations in *murMN* operon. 8. β -lactam resistance in laboratory mutants mediated by alterations in *ciaH* and *cpoA* genes. 9. Immunoprophylaxis. 10. Summary

Słowa kluczowe: antybiotyki β -laktamowe, geny mozaikowe, PBP, *S. pneumoniae*

Key words: β -lactam antibiotics, mosaic genes, PBP, *S. pneumoniae*

1. Wstęp

Streptococcus pneumoniae (pneumokok) jest Gram-dodatnim, katalazo-ujemnym ziarenkowcem, należącym do rodziny *Streptococcaceae*. Wielkość owalnych komórek waha się między 0,5 a 1,2 μ m średnicy. Tendencja tej bakterii do występowania w parach odzwierciedlona jest w jej polskiej nazwie: dwoinka zapalenia płuc, jak i dawnej nazwie systematycznej *Diplococcus pneumoniae*. Bakteria ta jest najczęstszą przyczyną bakteryjnych pozaszpitalnych zapaleń płuc i zapaleń ucha środkowego, jak również wywołuje zapalenia zatok, a także zagrażające życiu zakażenia krwi oraz ośrodkowego układu nerwowego. Przed wprowadzeniem do użytku antybiotyków zakażenia pneumokoko-

we zarówno płuc, jak i opon mózgowych w większości przypadków kończyły się śmiertelnie. W 1892 r. Sir William Osler określił zapalenie płuc jako „...naturalny koniec starych ludzi” [57]. Oprócz dorosłych po sześćdziesiątym roku życia, w grupie podwyższonego ryzyka znajdują się między innymi małe dzieci, osoby o obniżonej odporności immunologicznej, chorzy z przewlekłymi schorzeniami płuc oraz funkcjonalną lub anatomiczną asplenią, a także palacze, osoby z chorobą alkoholową oraz cukrzycy. Wzrost ryzyka zachorowalności wiąże się ze złymi warunkami socjalno-ekonomicznymi. Szacuje się, że na całym świecie umiera rocznie na zapalenie płuc około 3 milionów dzieci poniżej 5 roku życia, z czego blisko milion zgonów powodowana jest przez pneumokoki [26]. Podobna liczba

śmiertelnych przypadków wywołanych przez ten patogen szacowana jest wśród dorosłych [17]. Corocznie w Stanach Zjednoczonych odnotowuje się ok. 6 mln zapaleń ucha środkowego, 500 tys. zapaleń płuc, 55 tys. przypadków bakteriemii, 3 tys. zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych oraz 40 tys. zgonów powodowanych przez *S. pneumoniae* [72].

Rozwój zakażeń wywołanych przez pneumokoki jest poprzedzany kolonizacją tym patogenem nosogardła, umożliwiającą w dalszej kolejności penetrację do układu oddechowego, krwioobiegu i ośrodkowego układu nerwowego. Kolonizacja, czyli nosicielstwo nie wywołuje objawów chorobowych i najczęściej dla danego szczepu trwa od 3 do 4 miesięcy, wydłużając się w miesiącach zimowych [23, 49, 50]. Nosicielstwo znacznie częściej występuje u dzieci niż u dorosłych, osiągając w przypadku zdrowych dzieci poziom od 20% do 60%, a w przypadku zdrowych dorosłych od 5% do 10% [49, 50]. Poziom kolonizacji jest znacznie wyższy u dzieci przebywających w przedszkolach, żłobkach i domach dziecka, dodatkowo u tych dzieci częściej izoluje się szczepy odporne na penicylinę i inne antybiotyki [49, 50]. Wysoki poziom opornych izolatów od nosicieli związany jest z antybiotykoterapią, która sprzyja selekcji szczepów opornych [15].

Przez wiele lat penicylina była i nadal pozostaje lekiem z wyboru w leczeniu zakażeń wywołanych przez wrażliwe wobec antybiotyków β -laktamowych szczepy *S. pneumoniae*. W ostatnim czasie nastąpił szybki wzrost oporności na penicylinę i inne antybiotyki β -laktamowe, której dodatkowo towarzyszy oporność na inne leki, a zwłaszcza makrolidy, tetracykliny, kotrimoksazol i chloramfenikol. Obecnie oporność pneumokoków na antybiotyki β -laktamowe szerzy się na całym świecie prowadząc do dużych trudności terapeutycznych. Mimo to, zakażenia dróg oddechowych wywołwane szczepami o obniżonej wrażliwości na β -laktamy mogą być leczone większymi dawkami tych antybiotyków pod warunkiem, że w organizmie pacjenta przez odpowiedni okres czasu (dla penicyliny co najmniej 40% czasu a dla cefalosporyn 50% okresu między kolejnymi dawkami leku) zostanie utrzymane stężenie antybiotyku przekraczające minimalne hamujące stężenie antybiotyku (minimum inhibitory concentration, MIC). Postępowanie to jest nieskuteczne w przypadku szczepów opornych i średniowrażliwych, w sytuacji gdy zakażenie toczy się w ośrodkowym układzie nerwowym. W takim wypadku osiągnięcie efektu terapeutycznego wymaga podania wysokich dawek cefalosporyny III generacji (cefotaksymu lub ceftriaksonu). Niekiedy w przypadku szczepów wysoko opornych konieczne jest prowadzenie leczenia skojarzonego, np.: cefalosporyny III generacji z wankomycyną lub wankomycyny z rifampicyną. W przypadku leczenia zakażeń dróg oddechowych można rozważyć podanie któregoś

z nowych fluorochinolonów (moksifloksacyna, lewofloksacyna) lub linezolidu, ale nie powinny być one lekami pierwszego wyboru [39, 40].

2. Rozprzestrzenianie się oporności na penicylinę wśród *S. pneumoniae* na świecie

Według definicji Narodowego Komitetu d.s. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) *S. pneumoniae* odporne na penicylinę, to te szczepy, których wartość MIC dla penicyliny wynosi 2 $\mu\text{g/ml}$ lub więcej, szczepy średniowrażliwe to te, których MIC waha się między 0,12–1 $\mu\text{g/ml}$, natomiast MIC $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ określa wrażliwość na penicylinę [55]. Termin „niewrażliwe” (penicillin nonsusceptible pneumococci, PNSP) obejmuje zarówno odporne, jak i średniowrażliwe pneumokoki.

Przez ponad dwadzieścia lat od wprowadzenia do użytku penicyliny wśród klinicznych izolatów *S. pneumoniae* nie obserwowano szczepów opornych na ten antybiotyk. W 1967 roku w Australii i na Nowej Gwince wyizolowano pierwsze kliniczne izolaty odporne na penicylinę [34–37]. W końcu lat 70. ubiegłego wieku w Republice Południowej Afryki, a następnie na całym świecie, u wielu pacjentów z zapaleniami płuc, ucha środkowego, bakteremii i innych inwazyjnych chorób, zaczęto izolować szczepy niewrażliwe na ten antybiotyk [1, 2, 43]. Obecnie niewrażliwe na penicylinę pneumokoki są izolowane na całym świecie, osiągając w niektórych rejonach świata nawet 60–80% wśród klinicznych izolatów *S. pneumoniae* [44, 70].

Częstość występowania w krajach europejskich niewrażliwych na penicylinę pneumokoków różni się w dużym stopniu w zależności od kraju. Wśród szczepów wyizolowanych od chorych z zakażeniami dróg oddechowych w latach 1998–2000 w ramach projektu Alexander w krajach takich jak Irlandia, Hiszpania, Słowacja czy Francja *S. pneumoniae* niewrażliwe na penicylinę występują stosunkowo często ($>30\%$), osiągając szczególnie wysoki poziom w Hiszpanii (40,6%) i Francji (57,8%) [42]. Spośród krajów niebiorących udziału we wspomnianych badaniach wysoki poziom niewrażliwych izolatów odnotowuje się na Węgrzech (58% w 1991 r.) [51]. W Wielkiej Brytanii w ciągu kilku lat zaobserwowano znaczny wzrost ilości opornych izolatów z 4,6% w 1996 r. do 14,9% w 1998 r. [64]. Kraje o niskim procentowym udziale niewrażliwych izolatów to Holandia (3,8%), Niemcy (5,9%), Włochy (9,6%) i Belgia (9,6%) [42], oraz kraje skandynawskie (3–7%) [6]. Jeszcze w 1988 roku najmniej opornych izolatów w Europie opisywano w Irlandii Północnej, gdzie stanowiły poniżej 1% spośród wszystkich izolowanych *S. pneumoniae*, natomiast już w 1995 roku osiągnęły

poziom 10% [6]. W Polsce w latach 1996–2000 procent szczepów niewrażliwych na działanie penicyliny, izolowanych z zakażeń dolnych dróg oddechowych wynosił średnio 14,1%, z wahaniami od 9,0% w 1998 r. do 22,2% w 1999 r. [41]. Podobny udział opornych pneumokoków wynoszący 14,8% odnotowano wśród szczepów izolowanych w Polsce w latach 1997–2001 z zakażeń ośrodkowego układu nerwowego [68].

W Ameryce Północnej najwięcej niewrażliwych na penicylinę pneumokoków izolowanych od chorych z zakażeniami dróg oddechowych odnotowuje się w Meksyku, gdzie udział tych szczepów sięga 60% [44]. W Stanach Zjednoczonych niewrażliwe izolaty stanowią niespełna 35%, natomiast w Kanadzie 20% spośród wszystkich izolatów tego gatunku [44].

W Ameryce Południowej udział niewrażliwych na penicylinę izolatów z zakażeń dróg oddechowych utrzymuje się poniżej 20% w Brazylii (15,6%), Kolumbii (16,5%) i Argentynie (17,2%), natomiast bardzo wysoki poziom, sięgający 60% odnotowano w Urugwaju [44].

W większości afrykańskich państw, w których prowadzony jest monitoring, udział opornych izolatów waha się pomiędzy 5% a 10%. Wyjątkiem są kraje środkowej i południowej Afryki, gdzie odsetek ten sięga 20% [6, 47]. Bardzo wysoka oporność pneumokoków izolowanych na Wyspach Kanaryjskich (40%), związana jest z bliskością geograficzną i związkami z Hiszpanią.

Na kontynencie azjatyckim można zaobserwować bardzo duże wahania ilości niewrażliwych izolatów w zależności od kraju. Spośród jedenastu państw biorących udział w 1997 roku w programie ANSORP (Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens), którego celem było określenie stopnia oporności pneumokoków izolowanych z dolnych dróg oddechowych, największą liczbę niewrażliwych izolatów odnotowano w Południowej Korei (79,7%), Japonii (65,3%), Wietnamie (60,8%) i Tajlandii (57,9%), najmniej zaś w Chinach (9,8%), Malezji (9,0%) i Indiach (3,8%) [70].

W rejonie antypodów, w którym po raz pierwszy wykryto szczepy odporne na penicylinę, spośród klinicznych izolatów zebranych w 1997 roku niewrażliwością na penicylinę cechowało się 25,4% szczepów z Australii i 18,0% z Nowej Zelandii. Oporność w tym regionie wykazało, odpowiednio, 8,6% i 5% izolatów [9, 76].

3. Białka wiążące penicylinę – miejsca docelowe antybiotyków β -laktamowych u *S. pneumoniae*

S. pneumoniae należy do tych bakterii, u których nigdy nie stwierdzono występowania β -laktamaz – enzymów inaktywujących antybiotyki β -laktamowe poprzez hydrolizę pierścienia β -laktamowego w cząsteczce anty-

biotyku. Oporność klinicznych izolatów pneumokoków na penicylinę i inne antybiotyki β -laktamowe, związana jest ze zmianami struktury niektórych spośród tzw. białek wiążących penicylinę (penicillin binding proteins, PBP), stanowiących miejsce docelowe działania antybiotyków tej klasy [74, 80].

S. pneumoniae wytwarza sześć kodowanych w chromosomie bakteryjnym białek wiążących penicylinę PBP, które na podstawie masy cząsteczkowej i podobieństwa w sekwencji aminokwasowej zostały podzielone na dwie grupy: białka o wysokiej masie cząsteczkowej (high molecular weight, hmw) oraz białko o niskiej masie cząsteczkowej (low molecular weight, lmw) [22]. Hmw PBP są wielodomenowymi białkami, składającymi się z krótkiego cytoplazmatycznego regionu, pojedynczej domeny transmembranowej i dużego perioplazmatycznego regionu. Hmw PBP zostały podzielone na dwie klasy: A i B. Do klasy A należą PBP wykazujące zarówno aktywność glikozylotransferaz, jak i transpeptydaz: PBP1a (79.7 kDa), PBP1b (89.6 kDa) i PBP2a (80.8 kDa), natomiast do klasy B zostały włączone białka wykazujące aktywność transpeptydaz: PBP2x (82.3 kDa) i PBP2b (82.3 kDa) [29]. *S. pneumoniae* wytwarza tylko jedno lmw PBP – PBP3 (45.2 kDa) [29], wykazujące aktywność karboksypeptydaz i odpowiedzialne za usieciowanie peptydoglikanu.

PBP są to transpeptydazy glikopeptydowe, biorące udział w biosyntezie bakteryjnej ściany komórkowej, katalizując reakcje tworzenia wiązań poprzecznych między różnymi łańcuchami peptydoglikanu. Enzymy te posiadają trzy konserwowane motywy sekwencyjne znajdujące się w obrębie centrum katalitycznego: SXXK, SXN oraz KT/SG gdzie X oznacza dowolny aminokwas [32]. Penicylina hamuje aktywność enzymatyczną PBP poprzez tworzenie kowalencyjnych wiązań z resztą seryny w miejscu SXXK [28]. Powstanie kompleksu PBP – antybiotyk prowadzi do zahamowania biosyntezy ściany komórkowej i wzrostu komórki, a w konsekwencji lizy i śmierci bakterii.

Oporność na penicylinę związana jest z takimi zmianami w PBP, które prowadzą do obniżenia powinowactwa enzymu do antybiotyku. W takim przypadku do inaktywacji białek wymagana jest wyższa koncentracja antybiotyku. Spośród wszystkich sześciu PBP u klinicznych izolatów stwierdzono różne modyfikacje w pięciu z nich (Tabela I), natomiast u laboratoryjnych mutantów uzyskano zmienione formy wszystkich PBP [32]. Za podstawowe determinanty oporności *S. pneumoniae* na antybiotyki β -laktamowe uważa się zmodyfikowane PBP2x, PBP2b i PBP1a. Doświadczenia polegające na osobnym wprowadzeniu genów kodujących PBP2x i PBP2b o obniżonym powinowactwie do penicyliny doprowadziły do uzyskania oporności na ten związek przez wrażliwe szczepy biorcy [24]. Wśród opornych szczepów pneumokoków za znaczną

Tabela I
Warianty modyfikacji PBP wśród opornych
na antybiotyki β -laktamowe klinicznych izolatów *S. pneumoniae*

	lmw					hmw
	klasa A			klasa B		
	PBP1a	PBP1b	PBP2a	PBP2x	PBP2b	
wariant 1	wt	wt	wt	*	wt	wt
wariant 2	wt	wt	wt	wt	*	wt
wariant 3	wt	wt	wt	*	*	wt
wariant 4	wt	wt	*	*	wt	wt
wariant 5	wt	wt	*	*	*	wt
wariant 6	*	wt	wt	*	wt	wt
wariant 7	*	wt	wt	*	*	wt
wariant 8	*	wt	*	*	*	wt
wariant 9	*	*	*	*	*	wt

(wt) – PBP typu dzikiego; (*) – PBP o obniżonym powinowactwie względem antybiotyków β -laktamowych [3, 4, 7, 30, 32, 79]

redukcję powinowactwa zmodyfikowanego białka PBP2b do penicyliny odpowiada mutacja, występująca bezpośrednio za motywem SXN, prowadząca do zamiany reszty treoniny w pozycji 445 na resztę alaniny [16]. Zmiany w PBP1a niosą za sobą wysoką oporność tylko w przypadku, gdy szczep posiada już jedno lub dwa białka z klasy B hmw o obniżonym powinowactwie względem antybiotyków β -laktamowych [29]. Podobnie, nadanie oporności przez zmienione białko PBP2a warunkowane jest równoczesną modyfikacją przynajmniej białka PBP2x. Białko PBP2b nie wykazuje powinowactwa do cefalosporyn trzeciej generacji [31], toteż w przypadku oporności na tę grupę antybiotyków wymagana jest modyfikacja jednego z dwóch PBP: 2x lub 1a, bądź też obu. Ponieważ inhibicja PBP2b odgrywa kluczową rolę w indukcji lizy komórkowej, komórki pneumokoków w obecności cefalosporyn trzeciej generacji nie ulegają lizie [31]. Rola białka PBP1b w rozwoju oporności nie została do tej pory poznana [30], natomiast białko PBP3 zostało opisane jako determinanta oporności jedynie u mutantów laboratoryjnych opornych na cefotaksym [48].

4. Mozaikowe geny *pbp*

W przeciwieństwie do mutantów laboratoryjnych, u których obniżanie wrażliwości na penicylinę jest związane z nagromadzeniem się mutacji punktowych w genach kodujących PBP, nabywanie oporności przez izolaty kliniczne jest wynikiem horyzontalnego transferu genów od innych szczepów pneumokoków lub spokrewnionych komensalnych gatunków *Streptococcus*. Podobnie jak inni przedstawiciele rodzaju *Streptococcus*, pneumokoki osiągają w określonej fazie wzrostu stan naturalnej kompetencji, czyli zdolności

do pobierania cząsteczek DNA ze środowiska zewnętrznego. W wyniku horyzontalnej wymiany genów powstają geny *pbp* o tak zwanej strukturze mozaikowej. Geny mozaikowe zawierają obszary, które wykazują wysoką homologię sekwencji, bądź też są identyczne z sekwencjami analogicznych genów *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* czy *Streptococcus mitis*, zarówno szczepów opornych, jak i wrażliwych [12, 60, 62]. Różnice na poziomie sekwencji DNA sięgają 25% pomiędzy szczepami wrażliwymi a opornymi, co wiąże się z występowaniem do 10% różnic w sekwencji aminokwasowej [32].

Doświadczenia polegające na selekcji transformantów na niskim stężeniu cefotaksymu, w których niezależnie dawcami były wrażliwe szczepy *S. oralis* i *S. mitis*, a biorcą wrażliwy szczep *S. pneumoniae* wykazały, że pomiędzy wrażliwymi szczepami różnych gatunków zachodzi horyzontalny transfer genów [66]. Podczas analizy sekwencji nukleotydowej u jednego z opornych transformantów wykazano, że fragment genu *pbp2x* pochodzący od dawcy został oflankowany sekwencjami biorcy, w wyniku czego powstał nowy gen o mozaikowej strukturze. Z modyfikacją tego genu związany był wzrost wartości MIC transformata umożliwiający selekcję, jednakże przy wzroście wartości MIC z 0,02 $\mu\text{g/ml}$ do 0,03 $\mu\text{g/ml}$, nie można mówić o nadaniu oporności. Należy podkreślić, że w przypadku klinicznych izolatów modyfikacja genu *pbp2x* może prowadzić nawet do dziesięciokrotnego wzrostu wartości MIC.

Analiza sekwencji mozaikowych genów *pbp2b* i porównywanie ich z genami innych przedstawicieli rodzaju *Streptococcus* wykazało, że również geny *pbp2b* z wielu opornych na penicylinę izolatów *S. pneumoniae* zawierają jeden lub więcej fragmentów sekwencji pochodzących ze *S. mitis* [16]. Wszystkie te pneumokoki posiadają geny *pbp2b* kodujące białka o obniżonym powinowactwie do penicyliny. Odpowiedzialnym za tę cechę białek jest przynajmniej jeden z fragmentów nabyty od *S. mitis*. Żaden z badanych wrażliwych szczepów *S. mitis* nie posiadał PBP2b o obniżonym powinowactwie do penicyliny.

Horyzontalny transfer genów determinujących oporność jest również możliwy wewnątrz gatunku [13]. Przykładem mogą być identyczne sekwencje genów *pbp2x*, niespokrewnionych, opornych na penicylinę, międzynarodowych klonów Spain^{23F}-1 i Spain^{9V}-3 (zob. poniżej). W tym przypadku zarówno fragment mozaikowy genu, jak i regiony flankujące są identyczne. Fragment sekwencji identycznej z fragmentem mozaikowego genu *pbp2x* został także opisany u innego opornego międzynarodowego klonu Spain^{6B}-2. Jednak rozbieżności w pozostałych regionach tego genu w stosunku do genów z dwóch opisanych klonów, stawiają pod znakiem zapytania możliwość horyzontalnego transferu, w którym dawcą genu był jeden z klonów

Spain^{23F}-1 lub Spain^{9V}-3. Stwierdzono natomiast wysoki stopień homologii tego genu do genów wysoko opornych szczepów *S. oralis* i *S. mitis*. Dane te pozwalają przypuszczać, że gen *pbp2x* wszystkich opisanych powyżej szczepów pochodzi od wspólnego przodka i w skutek horyzontalnego transferu został rozpowszechniony wśród spokrewnionych gatunków rodzaju *Streptococcus* [32].

Podobna analiza została przeprowadzona dla genu *pbp1a*. Wyniki wskazują na istnienie wspólnego przodka tego genu dla klonów Spain^{23F}-1 i Spain^{9V}-3, które również w tym przypadku posiadają identyczną sekwencję badanego genu. Porównanie tej sekwencji z genem klonu Spain^{6B}-2 wyklucza bezpośredni transfer genu *pbp1a* między tymi klonami. Fragment genu *pbp1a* szczepu *S. mitis* o niskim poziomie oporności wykazuje wysoką homologię do genów omówionych klonów. Również w przypadku genu *pbp1a* można zatem wysunąć hipotezę o wspólnym przodku, który następnie został dawcą badanego genu dla różnych gatunków i szczepów *Streptococci* [32].

Skomplikowana budowa genów mozaikowych powoduje, że prawidłowe określenie sekwencji nabytych fragmentów genów może być bardzo trudne zwłaszcza, gdy nieznane są szczepy biorące udział w transformacji.

5. Klonalne rozprzestrzenianie się oporności na penicylinę

Streptococcus pneumoniae wytwarza szereg czynników zjadliwości, spośród których istotną rolę odgrywa otoczka zbudowana z wielocukrów. Ze względu na strukturę otoczki wyróżniono ponad dziewięćdziesiąt serotypów [38]. Około 80% inwazyjnych chorób wywoływanych przez te bakterie jest powodowana przez zaledwie 11 serotypów: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F i 23F [78]. Najczęściej spotykanymi wśród pneumokoków opornych na penicylinę, są izolaty reprezentujące serotypy 6B, 9V, 14, 19A, 19F i 23F [54, 67].

Rozprzestrzenienie się oporności na antybiotyki wśród pneumokoków nie jest równomierne wśród wszystkich szczepów. Populacja opornych pneumokoków została zdominowana przez niewielką liczbę klonów. W celu standaryzacji nomenklatury i klasyfikacji opornych międzynarodowych klonów pneumokoków w 1997 roku, pod auspicjami Międzynarodowej Unii Towarzystw Naukowych (dawniej International Association of the Microbiological Societies, obecnie International Union of Microbiological Societies), grupa współpracujących ze sobą ośrodków utworzyła, tzw. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN). Do chwili obecnej zostało opisanych 26 międzynarodowych klonów *S. pneumoniae*, w tym dwa po raz pierwszy zidentyfikowane w Polsce (Poland^{23F}-16

i Poland^{6B}-20). Nazwy międzynarodowych klonów zostały ujednoczone i składają się z nazwy kraju, w którym po raz pierwszy klon został zidentyfikowany, serotypu, numeru z kolekcji klonów, ewentualnie kolejnego opisanego serotypu. Oznaczenie Poland^{23F}-16 oznacza więc, że klon o serotypie 23F został po raz pierwszy zidentyfikowany w Polsce i był on szesnastym z kolei opisanym klonem międzynarodowym. Do nazewnictwa klonów pochodzących ze Stanów Zjednoczonych używa się nazw stanów, w których po raz pierwszy je zidentyfikowano, np. Tennessee^{23F}-4, Maryland^{6B}-17. Niektóre klony mogą reprezentować różne serotypy, np. Spain^{23F}-1-19F jest wariantem o serotypie 19F międzynarodowego klonu Spain^{23F}-1.

Aby klon mógł zostać włączony do bazy klonów PMEN musi spełniać następujące kryteria: a) być szeroko rozpowszechniony, tzn. mieć zasięg międzynarodowy; b) obecność klonu w populacji powinna trwać przez kilka lat; c) powinien być oporny na jeden lub więcej antybiotyków, które są w powszechnym klinicznym użyciu; d) przed włączeniem do bazy klonów dane dotyczące klonu muszą być opublikowane; e) izolaty klonu musi być dostępne, aby potwierdzić różnice z innymi międzynarodowymi klonami, i zdeponowany w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (American Type Culture Collection, ATCC) [53]. Wszelkie informacje dotyczące międzynarodowych klonów *S. pneumoniae* (numer typu sekwencji (sequence type, ST), określony na podstawie zmian w genach metabolizmu podstawowego (housekeeping genes) z wykorzystaniem metody tzw. MLST (multilocus sequence typing), profil genów *pbp*, obecność genu determinującego oporność na makrolidy, lekowrażliwość, wzory PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) oraz piśmiennictwo są dostępne w internecie pod adresem www.sph.emory.edu/PMEN.

Rozprzestrzenianie się penicylioopornych i wielolekoopornych pneumokoków jest związane w głównej mierze z rozprzestrzenianiem się opornych międzynarodowych klonów i ich wariantów. Oporny na penicylinę klon Spain^{23F}-1, po raz pierwszy zidentyfikowany we wczesnych latach 80. XX wieku, oraz jego warianty są obecnie izolowane na całym świecie. W Stanach Zjednoczonych blisko 40% spośród opornych izolatów pneumokoków należy właśnie do tego klonu, 12% należy do klonu Spain^{9V}-3 i jego wariantów, a 34% do kolejnych ośmiu klonów [14]. W sumie 85% opornych izolatów należy zaledwie do 10 klonów [14].

Spośród 26 opisanych międzynarodowych klonów, zaledwie 4 są wrażliwe na penicylinę, 8 jest średniowrażliwych, a 14 jest opornych. Oba międzynarodowe klony opisane po raz pierwszy w Polsce są wieloopornymi klonami. Klon Poland^{23F}-16 wykazuje oporność na penicylinę (MIC 8 μ g/ml), cefotaksym (MIC 8 μ g/ml), erytromycynę (MIC > 8 μ g/ml), tetracyklinę (MIC

16 µg/ml) oraz chloramfenikol (MIC 16 µg/ml), natomiast klon Poland^{6B}-20 jest średniowrażliwy na penicylinę (MIC 0,12 µg/ml), wrażliwy na cefotaksym (MIC 0,06 µg/ml) i chloramfenikol (MIC 2 µg/ml), ale oporny na erytromycynę (MIC >8 µg/ml) i tetracyklinę (MIC 16 µg/ml) [58, 63].

6. Tolerancja *S. pneumoniae* wobec penicyliny

Tolerancja na penicylinę u *S. pneumoniae* została po raz pierwszy opisana u laboratoryjnych szczepów w 1970 r. [73]. Zaobserwowano, że niektóre szczepy poddane działaniu penicyliny w stężeniu przewyższającym MIC nie ulegają lizie. Antybiotyk wobec szczepów oznaczających się tolerancją wykazuje właściwości bakteriostatyczne przy równoczesnym obniżonym działaniu bakteriobójczym. Trudność w identyfikacji tego typu szczepów polega na tym, że określenie wartości MIC nie pozwala na rozróżnienie szczepów wykazujących tolerancję od szczepów niewykazujących tolerancji [56]. Za wykazujące tolerancję względem penicyliny uważa się te szczepy, które po 4 godzinach w obecności benzylpenicyliny o stężeniu $10 \times \text{MIC}$ przeżywają w ilości nie mniejszej niż 1% [56]. Szczepy niewykazujące tolerancji w takich warunkach prawie całkowicie lizują, a ich przeżywalność nie przekracza 0,1%. Tolerancja może być również wykrywana poprzez mierzenie stosunku pomiędzy, tzw. minimalnym bakteriobójczym stężeniem antybiotyku (minimal bactericidal concentration, MBC) a MIC. Szczepy wykazujące wysoki stosunek MBC/MIC (≥ 32) mogą być uważane za wykazujące tolerancję. Niestety, metoda ta niesie ze sobą problemy związane z powtarzalnością [52]. Według różnych źródeł od 8% do 30% spośród klinicznych izolatów pneumokoków może wykazywać tolerancję na penicylinę [11, 56, 75], a częstość występowania tego fenotypu jest wyższa wśród szczepów o obniżonej wrażliwości na penicylinę niż wśród szczepów wrażliwych [56]. Tolerancja wobec antybiotyków u różnych mikroorganizmów może być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych i punktem wyjścia do uzyskania oporności [33].

7. Wysoki poziom oporności na antybiotyki β-laktamowe związany ze zmianami w operonie *murMN*

Oporność *S. pneumoniae* na antybiotyki β-laktamowe jest związana z modyfikacjami PBP, które są enzymami katalizującymi polimeryzację prekursorów ściany komórkowej podczas jej biosyntezy. Czy zatem modyfikacja PBP prowadząca do uzyskania oporności może prowadzić do zmiany oddziaływania tych białek z prekursorami ściany komórkowej. Ściana komórkowa

szczepów wrażliwych na penicylinę zawiera krótkie, nierozgałęzione peptydy o sekwencji L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala (iGln, izoglutamina). Zaobserwowano, że szczepy wykazujące oporność na penicylinę często posiadają ścianę komórkową o innej niż szczepy wrażliwe strukturze [19, 20, 21]. Różnica polega na przyłączeniu do grupy aminowej Lys podstawników Ala-Ser lub Ala-Ala. Strukturalna modyfikacja peptydoglikanu, tzw. rozgałęziona struktura, nie jest związana z reprezentowanym przez dany szczep serotypem czy miejscem izolacji, ale wykazuje silną korelację z opornością na penicylinę [21]. Sugeruje to, że modyfikacja miejsca aktywnego w PBP prowadząca do uzyskania oporności poprzez obniżenie powinowactwa do antybiotyków β-laktamowych prowadzi również do zmiany preferencji substratowej tych białek na bardziej hydrofobowe, rozgałęzione peptydy, a w konsekwencji do syntezy ściany komórkowej o zmodyfikowanej strukturze. Genom *S. pneumoniae* zawiera operon złożony z dwóch genów: *murM* i *murN*, które kodują enzymy niezbędne podczas biosyntezy ściany komórkowej o rozgałęzionej strukturze [19]. Inaktywacja operonu *murMN* w szczepach opornych prowadzi do utraty oporności na penicylinę oraz reorganizacji ściany komórkowej do struktury charakterystycznej dla szczepów wrażliwych, nie wpływając na tempo wzrostu i morfologię komórek [19]. Fakt ten wskazuje na związek pomiędzy funkcjonowaniem tych dwóch genów, a opornością na antybiotyki β-laktamowe oraz pozwala przypuszczać, że ich produkty są integralnym składnikiem mechanizmu oporności.

Porównanie sekwencji nukleotydowych genów *murM* ze szczepów opornych i wrażliwych wykazało istnienie obszarów, wewnątrz których różnice na poziomie aminokwasowym sięgają powyżej 10% [19]. Można przypuszczać, że geny *murM* opornych pneumokoków mogą powstawać na drodze rekombinacji, podobnie jak mozaikowe geny *pbp* [18, 19, 69]. Drugi z genów tego operonu *murN* nie wykazuje takiego stopnia modyfikacji, co sugeruje, że na obniżenie wrażliwości mają wpływ zmiany w obrębie genu *murM* [69].

Nie jest znany mechanizm, na drodze którego operon *murMN* wpływa na ekspresję oporności. Niewykluczone, że prekursorzy ściany komórkowej o rozgałęzionej strukturze wykazują wyższe powinowactwo względem zmodyfikowanych PBP niż cząsteczki antybiotyków zawierających pierścień β-laktamowy [21]. Inna hipoteza zakłada, że miejsce, które zajmują rozgałęzione peptydy w strukturze ściany komórkowej jest strategiczne i niezbędne podczas wzrostu i podziału komórki w obecności antybiotyku [19].

Wpływ modyfikacji operonu *murMN* na poziom oporności badano w doświadczeniach polegających na transformacji szczepu wrażliwego na antybiotyki β-laktamowe dwoma zestawami genów: *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*, *murMN* oraz *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x* ze szczepu

o wysokim poziomie oporności (penicylina MIC 16 $\mu\text{g/ml}$, cefotaksym MIC 4 $\mu\text{g/ml}$) [69]. Transformanty uzyskane w obu tych doświadczeniach wykazały oporność na penicylinę i cefotaksym, jednakże wysoki poziom oporności porównywalny ze szczepem, z którego pochodziły przeniesione geny wykazywały jedynie transformanty, które oprócz genów kodujących białka PBP uzyskały geny operonu *murMN*. Doświadczenia te pozwalają przypuszczać, że wysoki poziom oporności na antybiotyki β -laktamowe możliwy jest dzięki modyfikacjom operonu *murMN*.

Białka kodowane przez operon *murMN* są pierwszymi opisanymi po białkach PBP determinantami oporności na antybiotyki β -laktamowe wśród klinicznych izolatów pneumokoków, a produkty tego operonu mogą stać się potencjalnym celem nowych antybiotyków przeciwko opornym na penicylinę *S. pneumoniae*.

8. Oporność na antybiotyki β -laktamowe związana ze zmianami w genach *ciaH* oraz *cpoA* u mutantów laboratoryjnych

Analiza mutantów laboratoryjnych otrzymanych poprzez wielokrotne pasażowanie na podłożach z cefotaksymem i piperacyliną wykazała, że również punktowe mutacje niezwiązane ze zmianami w PBP mogą powodować niski poziom oporności na antybiotyki β -laktamowe. Oporność na cefotaksym była związana z wystąpieniem mutacji w genie *ciaH*, kodującym kinazę histydynową [27]. Natomiast oporność na piperacylinę uzyskano poprzez mutację w genie *cpoA* kodującym białko wykazujące homologię do glikozylotransferaz [25]. Produkty tych genów są wymagane podczas biosyntezy komponentów ściany komórkowej na etapie poprzedzającym zaangażowanie PBP [28]. System związany z genem *ciaH* kontroluje poziom przenośników lipidowych transportujących jednostki budulcowe ściany komórkowej przez błony, tym samym pośrednio reguluje tempo biosyntezy mureiny. Mutacje w genie *ciaH* mogą prowadzić do zwiększenia liczby przenośników lipidowych, a tym samym do podwyższenia poziomu syntezy mureiny [28]. W ten sposób gen *ciaH* pośrednio bierze udział w rozpoznawaniu i zapobieganiu niszczenia ściany komórkowej, jakie ma miejsce pod wpływem działania antybiotyków β -laktamowych. Produkt genu *cpoA* jest prawdopodobnie wymagany podczas biosyntezy kwasu tejchojowego [25]. Mutacja w tym genie może prowadzić do modyfikacji syntezy polimeru kwasu tejchojowego, zapobiegając działaniu antybiotyków skierowanym w strukturę ściany komórkowej. Zmiany w tych genach oprócz nadania oporności spowodowały utratę zdolności do transformacji (*ciaH*) lub znaczny sposób ją ograniczyły (*cpoA*) [25]. Wprowadzenie zmutowanych genów *ciaH* i *cpoA* do wrażliwych szczepów wywołało dwukrotne podnie-

sienie poziomu oporności pomimo ekspresji niezmodyfikowanych białek PBP [25].

9. Immunoprofilaktyka

Wprowadzenie powszechnych szczepień przeciwko *S. pneumoniae* może mieć istotne znaczenie dla ograniczenia rozprzestrzeniania się opornych na antybiotyki szczepów, równocześnie zmniejszając liczbę zakażeń wywoływanych przez ten patogen. Mimo że pneumokoki po raz pierwszy zostały opisane niezależnie przez Pasteura i Steinberga ponad sto lat temu, do tej pory nie udało się otrzymać szczepionki dającej w pełni odporność na wszystkie znane serotypy. Pierwsze próby immunizacji podjęto już na początku XX w., kiedy to preparatami z inaktywowanych komórek bakteryjnych szczepiono południowo-afrykańskich górników. W latach 40. ubiegłego wieku prowadzono pierwsze kliniczne testy szczepionek przeciwko czterem, a następnie sześciu serotypom. Wprowadzenie do klinicznego użycia penicyliny, spowodowało okresowe zaprzestanie prac nad konstruowaniem szczepionki. Niestety, szybko okazało się, że bakterie te w dalszym ciągu stanowią istotny problem terapeutyczny. Obecnie stosowana, dostępna na rynku od początku lat 80. XX wieku, 23-walentna szczepionka (PPV23), rekomendowana do szczepień ludzi dorosłych, skuteczna powyżej 2 roku życia zawiera oczyszczone polisacharydy wchodzące w skład otoczek dwudziestu trzech najczęściej wywołujących zakażenia serotypów: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F i 33F [59]. Ponieważ dzieci poniżej drugiego roku życia nie są zdolne do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej na polisacharydowe antygeny, do szczepień tej grupy wiekowej rekomendowana jest 7-walentna skoniugowana polisacharydowa szczepionka (PCV7). W jej skład wchodzi polisacharydy otoczkowe 7 serotypów: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F i 23F, skoniugowane z białkiem nośnikowym CRM₁₉₇, które jest inaktywowaną toksyną błoniczą otrzymywaną ze zmutowanego szczepu *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197) [61, 65]. Białko to było już wcześniej z powodzeniem wykorzystane do skonstruowania szczepionki przeciwko Hib (*Haemophilus influenzae* typu b). Polisacharydy otoczkowe wchodzące w skład PCV7 zostały wybrane spośród serotypów najczęściej wywołujących zakażenia inwazyjne, aby szczepionka dawała możliwie najszerszy zakres ochrony. Niestety, serotypy najczęściej występujące w Stanach Zjednoczonych i wykorzystane do skonstruowania szczepionki nie w pełni pokrywają się z serotypami najczęściej występującymi w Europie. Różnice w dystrybucji serotypów mogą prowadzić do obniżenia skuteczności szczepień na kontynencie europejskim [71, 77]. PCV7 jest niemal w 100% skuteczna w zapobieganiu inwazyjnych

zakażeń pneumokokowych powodowanych przez serotypy wchodzące w skład tej szczepionki [5, 8]. W Stanach Zjednoczonych 7-walentna skoniugowana polisacharydowa szczepionka przeciwko *S. pneumoniae* została włączona do kalendarza obowiązkowych szczepień w 2000 roku, zaledwie cztery miesiące po jej rejestracji. W latach 1978–1994 w Stanach Zjednoczonych szczepionki o serotypach, których polisacharydy otoczkowe zostały włączone do PCV7, były odpowiedzialne za 86% przypadków bakteriemii, 83% zapaleń opon mózgowych oraz 65% zapaleń ucha środkowego wśród dzieci poniżej 6 roku życia [10]. Już w pierwszym roku od wprowadzenia szczepionki zaobserwowano istotne zmiany w populacji pneumokoków w Stanach Zjednoczonych [45]. Porównując średnią z lat 1994–2000 z danymi z lat po wprowadzeniu obowiązkowych szczepień (2001–2002), coroczna liczba inwazyjnych zakażeń powodowanych przez pneumokoki u dzieci do 2 roku życia spadła o 58% w 2001 r. i 66% w 2002 r. Liczba zakażeń wywoływanych jedynie przez serotypy szczepionkowe w tej grupie wiekowej spadła o 63% w 2001 r. i 77% w 2002 r. W tym samym czasie liczba izolatów o „nieszczepionkowych” serotypach wzrastała, odpowiednio, o 28% i 66%. Zmiana częstości występowania serotypów nie zawsze oznacza rzeczywistą wymianę szczepów. Presja selekcyjna immunoprofilaktyki może powodować zwiększoną częstość, tzw. „capsule switching” – horyzontalnego transferu genów kodujących polisacharydowe otoczki [46]. Proces ten może prowadzić do zmiany serotypu „szczepionkowego” na „nieszczepionkowy” przy jednoczesnym zachowaniu innych cech drobnoustroju, w tym lekooporności. W 2002 roku zaobserwowano po raz pierwszy spadek częstości występowania szczepów niewrażliwych na penicylinę wśród izolatów *S. pneumoniae* u dzieci poniżej 2 roku życia, jednakże wśród szczepów o „nieszczepionkowych” serotypach nastąpił nieznaczny wzrost liczby izolatów wykazujących niewrażliwość na penicylinę [45].

Jak widać na przykładzie Stanów Zjednoczonych, wprowadzenie do kalendarza szczepień skoniugowanych szczepionek przeciwko pneumokokom pozwoliłoby w dużym stopniu zapobiegać zakażeniom wywoływanym przez *S. pneumoniae*, spowodowałoby zahamowanie rozprzestrzeniania się penicyliny- i wielolekoopornych szczepów pneumokoków oraz zredukowałoby zapotrzebowanie na antybiotyki. Oprócz niewątpliwych korzyści epidemiologicznych obowiązkowe szczepienia pozwoliłoby ograniczyć koszty związane z leczeniem zakażeń i powikłań wywołanych przez ten patogen. Niestety, koszty związane z masowymi szczepieniami PCV7 są tak wysokie, że stać na nie jedynie najbogatsze państwa. Do tej pory szczepionka ta została włączona do kalendarza szczepień jedynie w Stanach Zjednoczonych oraz w niektórych krajach europejskich lub ich regionach.

10. Podsumowanie

Prawie 40 lat od wyizolowania pierwszych klinicznych izolatów *S. pneumoniae* niewrażliwych na penicylinę oporność na ten antybiotyk, a często towarzysząca jej oporność na inne leki, rozpowszechniła się na całym świecie stanowiąc obecnie istotny problem zdrowia publicznego. Za ekspansję oporności na różne grupy antybiotyków wśród pneumokoków odpowiedzialna jest niewielka liczba wielolekoopornych klonów. Dlatego też monitorowanie rozprzestrzeniania się z jednoczesnym poznaniem genetycznych podstaw sukcesu tych klonów, oraz racjonalna polityka antybiotykowa i powszechne szczepienia to kluczowe strategie w kontroli oporności u *S. pneumoniae*.

Piśmiennictwo

1. Appelbaum P.C., Bhamjee A., Scragg J.N., Hallet A.F., Bowen A.J., Cooper R.C.: *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet*, **2**, 995–997 (1977)
2. Appelbaum P.C.: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An overview. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 77–83 (1992)
3. Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K.: Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1252–1255 (1999)
4. Asahi Y, Ubukata K.: Association of a thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2267–2273 (1998)
5. Asensi F., De Jose M., Lorente M., Moraga F., Ciuryla V., Arikian S., Casciano R., Vento M.: A pharmaco-economic evaluation of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine in Spain. *Value Health*, **7**, 36–51 (2004)
6. Baquero F.: Pneumococcal resistance to β -lactam antibiotics: a global geographic overview. *Microb. Drug Resist.* **1**, 115–120 (1995)
7. Barcus V.A., Ghanekar K., Yeo M., Coffey T.J., Dowson C.G.: Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 299–303 (1995)
8. Black S., Shinefield H., Fireman B., Lewis E., Ray P., Hansen J.R., Elvin L., Ensor K.M., Hackell J., Siber G., Malinoski F., Madore D., Chang I., Kohberger R., Watson W., Austrian R., Edwards K.: Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr. Infect Dis J.* **19**, 187–195 (2000)
9. Brett W., Masters P.J., Lang S.D., Ikram R.B., Hatch S.H., Gordon M.S.: Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in New Zealand. *N. Z. Med. J.* **112**, 74–78 (1999)
10. Butler J.C., Breiman R.F., Lipman H.B., Hofmann J., Facklam R.R.: Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978–94: implications for development of a conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **171**, 885–889 (1995)
11. Charpentier E., Tuomanen E.: Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect.* **2**, 1855–1864 (2000)

12. Coffey T.J., Dowson C.G., Daniels M., Spratt B.G.: Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**, 335–340 (1993)
13. Coffey T.J., Dowson C.G., Daniels M., Zhou J., Martin C., Spratt B.G., Musser J.M.: Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **5**, 2255–2260 (1991)
14. Corso A., Severina E.P., Petruk V.F., Mauriz R., Tomasz A.: Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb. Drug Resist.* **4**, 325–337 (1998)
15. De Lencastre H., Kristinsson K.G., Brito-Avo A., Sanches I.S., Sa-Leao R., Saldanha J., Sigvaldadottir E., Karlsson S., Oliveira D., Mato R., Aires de Sousa M., Tomasz A.: Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microb. Drug Resist.* **5**, 19–29 (1999)
16. Dowson C.G., Coffey T.J., Kell C., Whiley R.A.: Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2b in *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **9**, 635–643 (1993)
17. Fedson D., Scott J.A., Scott G.: The burden of pneumococcal disease among adults in developed and developing countries: what is and is not known. *Vaccine*, **17**, S11–S18 (1999)
18. Filipe S.R., Severina E., Tomasz A.: Distribution of the mosaic structured *murM* genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **182**, 6798–6805 (2000)
19. Filipe S.R., Tomasz A.: Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4891–4896 (2000)
20. Garcia-Bustos J., Chait B., Tomasz A.: Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J. Bacteriol.* **170**, 2143–2147 (1988)
21. Garcia-Bustos J., Tomasz A.: A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5415–5419 (1990)
22. Ghuysen J.M.: Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends Microbiol.* **10**, 372–380 (1994)
23. Gray H.: Epidemiology studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 month of life. *J. Infect. Dis.* **142**, 923–933 (1980)
24. Grebe T., Hakenbeck R.: Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 829–834 (1996)
25. Grebe T., Paik J., Hakenbeck R.: A novel resistance mechanism against β -lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J. Bacteriol.* **179**, 3342–3349 (1997)
26. Greenwood B.: The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**, 777–785 (1999)
27. Guenzi E., Gasc A.-M., Sicard M.A., Hakenbeck R.: A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **12**, 505–515 (1994)
28. Hakenbeck R., Grebe T., Zahner D., Stock J.B.: β -Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **33**, 673–678 (1999)
29. Hakenbeck R., Kaminski K., Konig A., van der Linden M., Paik J., Reichmann P., Zahner D.: Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **5**, 91–99 (1999)
30. Hakenbeck R., Konig A., Kern I., van der Linden M., Keck W., Billot-Klein D., Legrand R., Schoot B., Gutmann L.: Acquisition of five high- M_r penicillin-binding proteins variants during transfer of high-level β -lactam resistant *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **180**, 1831–1840 (1998)
31. Hakenbeck R., Tornette S., Adkinson N. F.: Interaction of nonlytic β -lactams with penicillin-binding proteins in *S. pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 755–760 (1987)
32. Hakenbeck R.: Mosaic genes and their role in penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis*, **19**, 597–601 (1998)
33. Handwerker S., Tomasz A.: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev. Infect. Dis.* **7**, 368–386 (1985)
34. Hansman D., Bullen M.M.: A resistant pneumococcus. *Lancet*, **2**, 264–265 (1967)
35. Hansman D., Devitt L., Miles H., Riley I.: Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med. J. Aust.* **2**, 353–356 (1974)
36. Hansman D., Glasgow H., Sturt J., Dewitt H.L., Douglas R.: Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N. Engl. J. Med.* **284**, 175–177 (1971)
37. Hansman D.: Type distribution and antibiotic sensitivity of pneumococci from carriers in Kiriwina, Trobriand Islands (New Guinea). *Med. J. Aust.* **2**, 771–773 (1972)
38. Henrichsen J.: Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2759–2762 (1995)
39. Hryniewicz W., Grzesiowski P., Meszaros J., Radzikowski A., Pirożyński M., Płusa T., Ozorowski T.: Zakażenia układu oddechowego. Etiologia, rozpoznawanie, leczenie. Rekomendacje 2003. Fundacja Centrum Mikrobiologii Klinicznej, Warszawa 2002
40. Hryniewicz W., Meszaros J.: Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń. Wyd. I. Wyd. Lekarskie PZWL. Warszawa 2001
41. Hryniewicz W.: Projekt Alexander – 5 lat w Polsce. *Pol. Merkuriusz Lek.* **14**, 5–8 (2003)
42. Jacobs M.R., Felmingham D., Appelbaum P.C., Gruneberg R.N.: The Alexander Project Group. The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 229–246 (2003)
43. Jacobs M.R., Koornhof H.J., Robins-Browne R.M., Stevenson C.M., Vermaak Z.A., Freiman I., Miller G.B., Witcomb M.A., Isaacson M., Ward J.I., Austrian R.: Emergence of multiply-resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.* **299**, 735–740 (1978)
44. Jones R.N.: The impact of antimicrobial resistance: changing epidemiology of community-acquired respiratory-tract infections. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **56**, (Suppl 3): S4–11 (1999)
45. Kaplan S.L., Mason Jr E.O., Wald E.R., Schutze G.E., Bradley J.S., Tan T.Q., Hoffman J.A., Givner L.B., Yogeve R., Barson W. J.: Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, **113**, 443–449 (2004)
46. Klugman K.P.: Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis.* **1**, 85–91 (2001)
47. Koornhof H.J., Wasas A., Klugman K.P.: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: A South African perspective. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 84–94 (1992)

48. Krauss J., Hakenbeck R.: Mutation in PBP3 of cefotaxime resistant laboratory mutant C604 and penicillin resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 936–942 (1997)
49. Kristinsson K.G.: Effect of antimicrobial use and other risk factor on antimicrobial resistance in pneumococci. *Microb. Drug Resist.* **3**, 117–123 (1997)
50. Marchant C.D.: Pneumococcal disease: the scope of the problem. *Contemp. Pediatr. (Suppl.)* Aug., 4–10 (1999)
51. Marton A., Gulyas M., Munoz R., Tomasz A.: Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J. Infect. Dis.* **163**, 542–548 (1991)
52. May J., Shannon K., King A., French G.: Glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 189–197 (1998)
53. McGee L., McDougal L., Zhou J., Spratt B.G., Tenover F.C., George R., Hakenbeck R., Hryniewicz W., Lefevre J.C., Tomasz A., Klugman K.P.: Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2565–2571 (2001)
54. Munoz R., Musser J.M., Crain M., Briles D.E., Marton A., Parkinson A.J., Sorensen U., Tomasz A.: Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 112–118 (1992)
55. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fourteenth international supplement. NCCLS document M100-S14. Wayne, Pennsylvania 2004
56. Normark B. H., Novak R., Ortvist A., Kallenius G., Tuomanen E., Normark S.: Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* exhibiting decreased killing by vancomycin. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 552–558 (2001)
57. Osler W.: The principles and practice of medicine, 1st ed. D. Appleton and Co. New York, N.Y. 1892
58. Overweg K., Hermans P.W., Trzciński K., Sluijter M., de Groot R., Hryniewicz W.: Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification of emerging clones. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1739–1745 (1999)
59. Plotkin S.A., Orenstein W.A.: Vaccines. W.B. Saunders Co. III Ed. s. 569–570, Philadelphia 1999
60. Potgieter E., Chalkley L.: Relatedness among penicillin-binding protein 2b genes of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **1**, 35–42 (1995)
61. Rappuoli R.: Isolation and characterization of *Corynebacterium diphtheriae* nontandem double lysogens hyperproducing CRM197. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 560–564 (1983)
62. Reichmann P., König A., Linares J., Alcaide F., Tenover F.C., McDougal L., Swidsinski S., Hakenbeck R.: A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **176**, 1001–1012 (1997)
63. Sadowy E., Zhou J., Meats E., Gniadkowski M., Spratt B.G., Hryniewicz W.: Identification of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Poland by multilocus sequence typing. *Microb. Drug Resist.* **9**, 81–86 (2003)
64. Schito G.C., Debbia E.A., Marchese A.: The evolving threat of antibiotic resistance in Europe: new data from the Alexander Project. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, Topic T1, 3–9 (2000)
65. Shinefield H.R., Black S., Ray P., Chang I., Lewis N., Fireman B., Hackell J., Paradiso P.R., Siber G., Kohberger R., Madore D.V., Malinowski F.J., Kimura A., Le C., Landaw I., Aguilar J., Hansen J.: Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in infants and toddlers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 757–763 (1999)
66. Sibold C., Henrichsen J., König A., Martin C., Chalkley L., Hakenbeck R.: Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol. Microbiol.* **12**, 1013–1023 (1994)
67. Sibold C., Wang J., Henrichsen J., Hakenbeck R.: Genetic relationship of penicillin-susceptible and – resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect. Immun.* **60**, 4119–4126 (1992)
68. Skoczyńska A., Hryniewicz W.: Genetic relatedness, antibiotic susceptibility, and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* responsible for meningitis in Poland, 1997–2001. *Microb. Drug Resist.* **9**, 175–182 (2003)
69. Smith A.M., Klugman K.P.: Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2393–2396 (2001)
70. Song J.H., Lee N.Y., Ichiyama S., Yoshida R., Hirakata Y., Fu W., Chongthaleong A., Aswapokee N., Chiu C.H., Lalitha M.K., Thomas K., Perera J., Yee T.T., Jamal F., Warsa U.C., Vinh B.X., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., Pai C.H.: Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1206–1211 (1999)
71. Spratt B.G., Greenwood B.M.: Prevention of pneumococcal disease by vaccination: does serotype replacement matter? *Lancet*, **356**, 1210–1211 (2000)
72. Steinhoff M.C.: Resistant pneumococcus: the challenge for pediatrics. *Contemp. Pediatr. (Suppl.)* Nov., 4–11 (1998)
73. Tomasz A., Albino A., Zanati E.: Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, **227**, 138–140 (1970)
74. Tomasz A.: Penicillin-binding proteins in bacteria. *Ann. Inter. Med.* **5**, 502–504 (1982)
75. Tuomanen E., Durack D.T., Tomasz A.: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 521–527 (1986)
76. Turnidge J.D., Bell J.M., Collignon P.J.: Rapidly emerging antimicrobial resistances in *Streptococcus pneumoniae* in Australia. Pneumococcal Study Group. *Med. J. Aust.* **170**, 152–155 (1999)
77. von Kries R., Siedler A., Schmitt H.J., Reinert R.R.: Proportion of invasive pneumococcal infections in German children preventable by pneumococcal conjugate vaccines. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 482–487 (2000)
78. Wuorimaa T., Kayhty H.: Current state of pneumococcal vaccines. *Scand. J. Immunol.* **56**, 111–129 (2002)
79. Yamane A., Nakano H., Asahi Y., Ubukata K., Konno M.: Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1257–1259 (1996)
80. Zigelboim S., Tomasz A.: Penicillin-binding proteins of multiply antibiotics resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 434–442 (1980)

Bożena Bukowska, Jarosław Walory

Zakład Profilaktyki Zakażeń i Zakażeń Szpitalnych, Zespół Badań Mikrobiologicznych
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa;
tel. (22) 841-40-71 w 206, e-mail: walory@cls.edu.pl

Wpłynęło w grudniu 2004 r.

1. Wstęp. 2. Zmiany w systematyce. 3. Charakterystyka rodziny *Anaplasmataceae*. 4. Środowisko naturalne. 5. Epidemiologia. 6. Znaczenie kliniczne rodziny *Anaplasmataceae*. 6.1. Zakażenia u ludzi. 6.2. Zakażenia u zwierząt. 7. Diagnostyka *Anaplasma phagocytophilum*. 7.1. Hodowla. 7.2. Testy serologiczne. 7.3. Diagnostyka molekularna. 8. Leczenie. 9. Prewencja. 10. Badania w Polsce. 11. Podsumowanie

***Anaplasma phagocytophilum* – epidemiology, diagnostics and therapy**

Abstract: *Anaplasma phagocytophilum* is an etiological agent of human anaplasmosis (human granulocytic ehrlichiosis), an emerging tick-borne zoonosis occurring in the Europe and the United States. This is obligate intracellular parasite. The paper presents actual problems in epidemiology, diagnostics and therapy of this relatively rare pathogen.

1. Introduction. 2. Modification in taxonomy. 3. Description of the genera *Anaplasmataceae*. 4. Natural habitats. 5. Epidemiology. 6. Clinical significance. 6.1. Infection of human. 6.2. Infection of animals. 7. Diagnostics. 7.1. Culture. 7.2. Serological tests. 7.3. Molecular diagnostics. 8. Treatment. 9. Prevention. 10. Study in Poland. 11. Summary

Słowo kluczowe: *Anaplasma phagocytophilum*, (HGE)

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, (HGE)

1. Wstęp

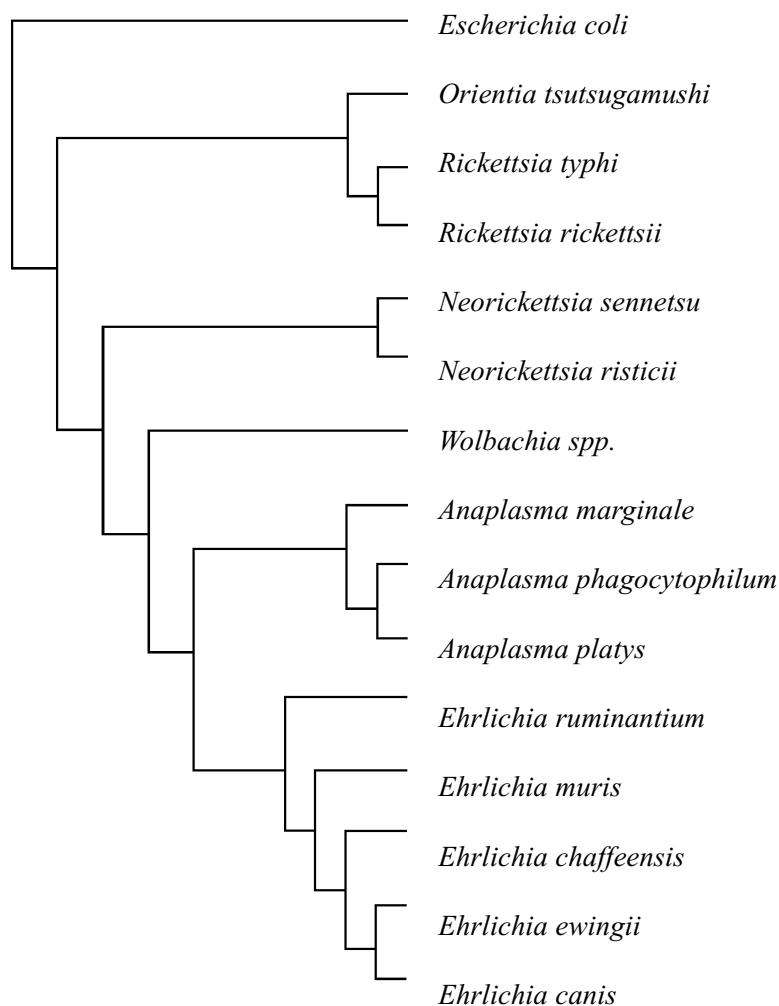
Choroby przenoszone przez kleszcze stanowią coraz poważniejszy problem zdrowia publicznego. Wzrost liczby nowych jednostek chorobowych spowodował, że ich charakterystyka, przewidywanie zagrożeń, wprowadzenie odpowiedniej diagnostyki i terapii stało się w ostatnich latach bardzo istotne. Wzrost liczby stwierdzanych przypadków najprawdopodobniej związany jest z dynamicznym rozwojem metod diagnostycznych. Przypuszcza się, że spowodowany może być również zmianami klimatycznymi (ciepłe i krótkie zimy) wpływającymi na proces transmisji mikroorganizmów. Najbardziej rozpowszechnioną obecnie na półkuli północnej zoonozą jest borelioza z Lyme obserwowana na początku XX w, a opisana w roku 1982. W ciągu następnych lat zidentyfikowano kilkanaście gatunków drobnoustrojów odpowiedzialnych za zoonozę odkleszczowe [61].

2. Zmiany w systematyce

W ostatnim czasie obserwuje się duże zmiany w systematyce jak i w nazewnictwie tej grupy mikroorganizmów, które wynikają z uwzględnienia badań genetycznych.

Rozpatrywania filogenetyczne dotychczas uwzględniały: serologiczne reakcje krzyżowe, analizę porównawczą najbardziej immunogennych białek powierzchniowych i tropizm komórkowy tych bakterii [2, 28].

Zmiany dotyczą organizmów blisko spokrewnionych z rodzajem *Rickettsia* i *Orientia*, klasycznie rozpatrywanych do tej pory jako rodzaj *Ehrlichia*. Nowa klasyfikacja w dużej mierze oparta jest na analizie sekwencji genów 16S rRNA i operonów *gro* ESL [28]. Główne zmiany obejmują przydział wszystkich gatunków rodzajów *Ehrlichia* i *Wolbachia* do rodziny *Anaplasmataceae* ze zubożeniem dotychczasowej struktury rodziny *Rickettsiaceae* (Rys. 1). Wszystkie „odkleszczowe” bakterie *Anaplasmataceae* zgrupowano teraz w dwóch blisko spokrewnionych rodzajach: *Ehrlichia* i *Anaplasma*. Dawne gatunki grupy *Ehrlichia phagocytophila* (*E. equi* i czynnik HGE) połączono w jeden gatunek *Anaplasma phagocytophila* w obrębie rodzaju *Anaplasma*. Ponieważ początkowo niewłaściwie użyto nazwy łacińskiej, ponownie zmieniono nazwę tego gatunku na prawidłową – *Anaplasma phagocytophilum* (*Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2002, **52**: 5–6). Do rodzaju *Anaplasma* przydzielone zostały gatunki *E. platys* i *E. bovis* i przemianowane na *A. platys* i *A. bovis*. *Cowdria ruminantium*, patogen przeżuwaczy, ściśle spokrewniony z *E. canis* został przeniesiony do rodzaju *Ehrlichia* jako *E. ruminantium*.



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne rodzajów *Ehrlichia*, *Anaplasma* oraz *Wolbachia spp.* oparta na analizie podobieństwa genu kodującego 16S rybosomalnego RNA. *Escherichia coli* przedstawiono jako punkt odniesienia

Gatunki nieprzenoszone przez kleszcze (*Ehrlichia sennetsu* i *Ehrlichia risticii*) przydzielono do rodzaju *Neorickettsia*. Gatunki rodzaju *Wolbachia* nie uległy przeklasyfikowaniu. Tak więc ludzkie patogeny zawarte są teraz w rodzajach: *Ehrlichia* (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*), *Anaplasma* (*A. phagocytophilum*) i *Neorickettsia* (*N. sennetsu*) (Tabela I), a zakażająca pasożyty jelitowe *Wolbachia spp.* są rozpatrywane oddzielnie [75].

Podczas gdy gatunki *Ehrlichia* zakażają przeważnie monocytów ssaków, gatunki *Anaplasma* zakażają granulocyty. Gatunki *Neorickettsia* zakażają przede wszystkim jednojądrzaste fagocyty i sporadycznie komórki nabłonka jelit. Przynależność taksonomiczna rodzaju *Aegyptianella* jest obecnie nieokreślona.

3. Charakterystyka rodziny *Anaplasmataceae*

Historia badań nad tymi drobnoustrojami zaczęła się w 1889 roku, kiedy to Kurloff po raz pierwszy opisał przypominające *Ehrlichia* wewnątrzkomórkowe

wtręty w jednojądrzastych komórkach świnek morskich [2]. W 1910 roku, odkleszczowe wewnątrzerytrocytarne bakterie przeżuwaczy nazwano – *Anaplasma marginale*, jednocześnie zaproponowano nazwę rodzaju – *Ehrlichia*.

Anaplasma spp. i *Ehrlichia spp.* należą do obligatoryjnych wewnątrzkomórkowych Gram-ujemnych bakterii, namnażających się i bytujących w wakuolach leukocytów krwi: granulocytach, monocytach, erytrocytach, trombocytach oraz w przypadku *E. ruminantium*, również wewnątrz komórek śródbłonka [2, 66]. Gatunki rodzajów *Anaplasma* i *Ehrlichia* przenoszone są między żywicielami poprzez ukłucia kleszczy, natomiast gatunki rodzajów *Wolbachia* i *Neorickettsia* nie wykazują tego rodzaju transmisji. Pojedyncze, małe (0,2 do 0,4 μm) zwarte formy bakteryjnych komórek przypominają ciała elementarne *Chlamydia*. Mogą one mieć również większe rozmiary (0,8 do 1,5 μm) przypominające ciała retikularne [2]. Oba rodzaje są zdolne do podziału binarnego. Po kilku dniach od zakażenia, ciała elementarne dzielą się w fagosomie poczynając

Tabela I

Wybrane gatunki *Anaplasma*, *Ehrlichia* i *Neorickettsia* chorobotwórcze dla człowieka

Gatunek	Poprzednia nazwa	Wektor	Choroba*	Zakażany organizm	Zakażane komórki	Rezerwuuar
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>E. equi</i> <i>E. phagocytophila</i> Czynnik HGE	<i>Ixodes</i> spp.	EGE TBF HA (HGE) Pies	Konie Przeżuwacze Człowiek	Granulocyty	Jeleniowate, Owca Białe myszki
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>		<i>Amblyomma americanum</i> <i>Dermacentor variabilis</i>	HME	Człowiek Pies	Jednojądrzaste leukocyty	Jeleniowate Psy domowe
<i>Ehrlichia ewingii</i>		<i>Amblyomma americanum</i>	CGE EE	Pies Człowiek	Granulocyty	Psowate
<i>Neorickettsia sennetsu</i>	<i>Ehrlichia sennetsu</i>		SF	Człowiek	Jednojądrzaste leukocyty	Przywry rybne

* EGE – końska ehrlichioza granulocytna (Equine Granulocytic Ehrlichiosis); TBF – Gorączka odkleszczowa (Tick-Borne Fever); HA (HGE) – ludzka anaplazmoza (Human Anaplasmosis); CGE – psia ehrlichioza granulocytna (Canine Granulocytic Ehrlichiosis); EE – ehrlichioza *E. ewingii* (*E. ewingii* ehrlichiosis); SF – Gorączka sennetsu (Sennetsu Fever).

od początkowych pleomorficznych inkluzji do mikrokoloni znanej morułą [15].

W przeciwieństwie do *Rickettsia* spp., gatunki rodzajów *Anaplasma* i *Ehrlichia* nie wykazują zgrubienia zewnętrznej błony. Błona ta wydaje się być bardziej pomarszczona w przypadku *A. phagocytophilum* niż *N. sennetsu* czy *E. chaffeensis* [66]. Cechą charakterystyczną w morfologii ściany komórkowej jest brak lipopolisacharydów i lipooligosacharydów, a w mikroskopii elektronowej wykazują śladowe ilości peptydoglikanu. Wolne komórki *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp. metabolizują L-glutaminian, nie metabolizują glukozy czy glukozy-6-fosforanu, co sugeruje brak tradycyjnego szlaku glikolizy. Rozmiar genomu *A. phagocytophilum* wynosi około 1500 kb, podczas gdy *E. chaffeensis* 1200 kb, a genom *N. sennetsu* posiada 800 kb [7, 61].

A. marginale i *Aegyptianella* spp. są również przenoszonymi przez kleszcze wewnątrzerytrocytarnymi bakteriami przeżuwaczy oraz ptaków, płazów i gadów. Nie stwierdzono żadnego ich związku z chorobami ludzkimi. Organizmy te występują jako małe, związane z błonami inkluzje [14].

4. Środowisko naturalne

Anaplasma spp. i *Ehrlichia* spp. są czynnikami przenoszonymi na zwierzęta i ludzi najczęściej przez ukłucia kleszczy. W przypadku *Neorickettsia* do transmisji dochodzi prawdopodobnie poprzez spożywanie zakażonych ryb. Wektory przenoszenia chorób wywołanych przez znane gatunki zakażające człowieka stanowią: dla *A. phagocytophilum* – rodzaj *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *I. scapularis*, *I. pacificus* oraz *I. ricinus*); dla *E. chaffeensis* – *Amblyomma americana*

i prawdopodobnie *Dermacentor variabilis*; dla *E. ewingii* – *Amblyomma americanum* i dla *E. canis* – *Rhipicephalus sanguineus* [2].

Istnienie endemicznych obszarów występowania chorób odkleszczowych jest ściśle powiązane z obecnością wektora, ale także grupy kręgowców określanych mianem rezerwuaru. Obecność *A. phagocytophilum* potwierdzono dotychczas u ponad 200 gatunków kręgowców [34]. Transstadialna transmisja u kleszczy pozwala gatunkom *Anaplasma* spp. na szersze rozprzestrzenianie się w środowisku. W Europie obieg organizmów chorobotwórczych odbywa się na zasadzie krążenia pomiędzy gatunkami kręgowców (ssaki, ptaki) przy udziale głównie kleszcza pastwiskowego *Ixodes ricinus*. Główną drogą zakażenia się kleszczy jest ich żerowanie na rezerwuarze, który stanowi naturalne źródło tych patogenów, a także poprzez transmisję patogenów odbywającą się pomiędzy zainfekowanym osobnikiem a grupą nie zakażonych kleszczy podczas ich współżerowania (co-feeding). Pozostała grupa kręgowców stanowi tzw. amplifikatory, które są żywicielami kleszczy, ale nie są zdolne do ich zakażenia, ułatwiają one utrzymanie patogenu w danym ekosystemie. Stwarza to wzrost ryzyka zakażenia na tym obszarze. Człowiek zakażony jest tylko przypadkowo i stanowi ostatnie stadium dla tych patogenów. Za rezerwuara *A. phagocytophilum* uważane są małe ssaki, takie jak: mysz drzewna (*Apodemus sylvaticus*), mysz leśna (*Apodemus flavicollis*), ryjówka aksamitna (*Sorex araneus*). W Europie jako rezerwuara uważa się przede wszystkim nornicę rudą (*Clethrionomys glareolus*) [52]. *A. phagocytophilum* została wykryta również u ssaków takich jak owce, psy, kozy i konie [7, 52]. Z badań Greg i wsp. 1996 [35] wynika, że psy mogą stanowić potencjalny rezerwuara i mieć znaczący wpływ na rozprzestrzenianie się drobnoustroju.

Transmisja chorób wywołanych przez *A. phagocytophilum* i *B. burgdorferi* s.l. odbywa się przy udziale tego samego wektora, w związku z tym oczywiste jest stwierdzenie mieszanych zakażeń zarówno u kleszczy jak i u ludzi. Wiadomo, że ptaki odgrywają dużą rolę w epidemiologii boreliozy z Lyme. Nieliczne badania sugerują, że ptaki w przypadku *A. phagocytophilum* mogą pełnić rolę nośnika [5]. Brak jest badań dotyczących innych potencjalnych rezerwuarów.

5. Epidemiologia

Na podstawie szczegółowych badań serologicznych i genetycznych w roku 1996 w Słowenii po raz pierwszy rozpoznano ludzką anaplazmozę – HA (human anaplasmosis) [62]. Od tego czasu zakażenia *A. phagocytophilum* zostały opisane w Słowenii [63], Danii [67], Hiszpanii [59], Szwecji [73], Norwegii [47]. W roku 2001 doniesiono o pierwszych przypadkach zachorowań w Polsce [74]. Doniesienia o zachorowaniach wskazują na możliwe rozprzestrzenianie się choroby na całym kontynencie.

Nieliczne badania epidemiologiczne dotyczące *A. phagocytophilum* przeprowadzone w Europie przedstawiono w tabeli II [13]. W zależności od geograficznej lokalizacji, rozpowszechnienie *Anaplasma phagocytophilum* u kleszczy *I. ricinus* zawiera się w przedziale od 0,4% do 66,7% [13, 59] (Tabela I). W okresie wysokiej aktywności kleszczy na określo-

nym terenie *Anaplasma phagocytophilum* jest częściej wykrywana u osobników dorosłych niż u nimf [52, 79], chociaż istnieją także doniesienia o wysokim odsetku infekcji u nimf [47, 59].

Analiza przypadków w Europie wykazała, że większość pacjentów (67%) donosiła o ekspozycji na kleszcza czy ukłucie przez kleszcza od tygodnia do miesiąca przed wystąpieniem objawów [13, 59, 74], natomiast czas trwania leczonej choroby wynosił najczęściej od 2 tygodni do 3 miesięcy. Średnia wieku chorych wynosiła 38 lat (5–70 lat), blisko 20% pacjentów stanowiło grupę poniżej 29 roku życia, a 53% przypadków występowało u mężczyzn [13]. Większość przypadków przypadała na okres urlopowy w zależności od regionu między czerwcem a sierpniem (73%). Na okres szczytu zachorowań mogą mieć wpływ różnice w warunkach środowiskowych oddziałujące pośrednio na wektor zakażenia i gatunki stanowiące rezerwuar.

Do grupy ryzyka zakażenia należą osoby pracujące w gospodarstwach rolnych, leśnicy, myśliwi, a także rzeźnicy, którzy mają kontakt z zakażoną krwią zwierzęcą [23].

6. Znaczenie kliniczne rodziny *Anaplasmataceae*

6.1. Zakażenia u ludzi

Pod względem klinicznym u człowieka wyróżnia się trzy postaci choroby wywołane przez organizmy z rodziny *Anaplasmataceae* [77] (Tabela I):

Tabela II
Dane seroepidemiologiczne dotyczących częstości występowania anaplazmozy (HGE) w Europie

Kraj (literatura)	% zakażeń u kleszczy	% zakażeń u pacjentów z boreliozą	% zakażeń u osób żyjących na terenach endemicznych	% zakażeń u osób z grup ryzyka	% zakażeń u osób zdrowych
Dania [67]		21%			3,8%
Francja [60]	1,25%	1,6%	17%		
Niemcy [30]		11,4%		14%	
Włochy [58]	24,4%		1,5%	8,6%	
Norwegia [47]	6–11,5%	10,2%			
Słowenia [63]	3,2%				
Hiszpania [59]	0–25% (dorosłe)				
	0,4–66,7% (nimfy)	2,3%			0–1,9%
Szwecja [73]	6,6%	8,1%	11,5%		
Szwajcaria [52, 79, 64]	0,4–2,1%			17,1%	
Polska [18, 21, 33, 36, 37, 38, 65]					
Północno-wschodnia	19,5% 1,4% nimfy [36] 8,7% [38]		6,2% [36] 16%–24% [18] 9,1% [38]	7,2% [37]	2% [38]
Północno-zachodnia	1,75% [65]				
Południowo-wschodnia		7,3% [33]		21,5% [21] 23,6% [33]	5,3% [21]

- 1) ludzką anaplazmozę (HA – human anaplasmosis) wywoływaną przez *A. phagocytophilum* (poprzednio – czynnik HGE, a następnie *A. phagocytophila*), dotyczącą granulocytów, rozpoznawaną w Ameryce Północnej i w Europie. Do niedawna HA określana była jako ludzka granulocytarna ehrlichioza (HGE, human granulocytic ehrlichiosis);
- 2) ludzką monocytarną ehrlichiozę (HME, human monocytic ehrlichiosis) wywoływaną przez *Ehrlichia chaffeensis*, dotyczącą komórek jednojądrzastych, głównie monocytów krwi, występująca głównie w USA;
- 3) SE (Sennetsu Ehrlichiosis) – ehrlichiozę wywoływaną przez *Ehrlichia sennetsu*, dotyczącą uszkodzenia monocytów (spotykaną dotychczas prawie wyłącznie w Japonii).

Z przyczyn historycznych oraz podobieństwa zakażeń u ludzi choroby wywoływane przez organizmy z rodziny *Anaplasmataceae* wciąż jeszcze często określane są wspólną nazwą – ehrlichiozy.

Większość dotychczasowego piśmiennictwa dotyczy HGE, ze względu na uniknięcie niekonsekwencji związanej z nazewnictwem, w artykule będziemy posługiwali się już wcześniej proponowaną nazwą anaplazmoza [19]. Nazwa ta, mimo, że nie uwzględnia rodzaju zakażanych komórek jest odpowiednia, ponieważ jak dotychczas nie jest znany inny gatunek rodzaju *Anaplasma* wywołujący zakażenia u ludzi.

6.1.1. Anaplazmoza (poprzednio HGE). Pierwsze przypadki ludzkiej anaplazmozy stwierdzono w 1990 roku u pacjenta w Wisconsin (USA), po ukłuciu kleszcza [8]. Do zakażenia najczęściej dochodzi w wyniku transmisji drobnoustroju po ukłuciu zakażonego kleszcza. Bardzo rzadko dochodzi do zakażeń innymi drogami, jednak powinny one być również brane pod uwagę. Udokumentowano przypadek zakażenia u noworodka, który najprawdopodobniej był wynikiem transmisji drobnoustroju przez łożysko [42]. Do zakażenia może dojść także poprzez transfuzję krwi [48].

Ponieważ HA i HME nie podlegają rejestracji, a diagnostyka jest słabo rozwinięta, prawdziwa liczba przypadków i rozprzestrzenienie zakażeń są nieznane. Zakażenia subkliniczne są prawdopodobnie dość częste, na co wskazują odsetki przeciwciał stwierdzanych u zdrowych ludzi.

Ludzka anaplazmoza jest chorobą trudną do rozpoznania ze względu na brak charakterystycznego obrazu klinicznego, a także dość częste nie potwierdzanie kontaktu z kleszczem (od 9% do 25% pacjentów) w wywiadzie epidemiologicznym [7, 13]. Dopiero pojawienie się w wywiadzie informacji o pokłuciu przez kleszcza jest najczęściej wskazówką do przeprowadzenia badań diagnostycznych, między innymi w kierunku anaplazmozy. Badania wskazują na występowanie *A. phagocytophilum* podobnie jak *B. burgdorferi* s.l.

w gruczołach ślinowych kleszcza [60]. Podczas ukłucia po przeniknięciu przez skórę, *A. phagocytophilum* rozprzestrzenia się drogą naczyń chłonnych i krwionośnych. Docelowo atakuje komórki układu krwiotwórczego oraz siateczkowo-śródbłonkowego [64]. Wykryto ją we krwi obwodowej, zatokach brzeżnych śledziony, węzłach chłonnych, nerkach, płynie mózgowo-rdzeniowym i płucach [63]. Po rozpadzie komórek i uwolnieniu się drobnoustrojów do krwi, następuje wtórne zakażenie wielu narządów i tkanek. Okres inkubacji dla ludzkiej anaplazmozy po ukłuciu przez kleszcza wynosi 7 do 10 dni [3, 8, 11]. Po zakażeniu mogą nie występować żadne objawy. Jeśli występują, są to najczęściej niespecyficzne objawy grypo-podobne (gorączka powyżej 39°C, dreszcze, bóle mięśni, bóle stawowe, nadmierne pocenie się). U większości pacjentów, już podczas wczesnego etapu choroby stwierdzano leukopenię, trombocytopenię i podwyższoną aktywność transaminazy asparaginianowej. Po pierwszym tygodniu zakażenia często zauważana była limfocytoza z atypowymi limfocytami [2, 6]. Opisano także objawy żołądkowo-jelitowe: mdłości, wymioty, biegunkę i bóle brzucha [59, 74].

Obserwowano powiększenie wątroby lub śledziony [74]. Lokalizacja wątrobowa *A. phagocytophilum* jest przyczyną martwicy hepatocytów i cholestazy wewnątrzwątrobowej, szpikowa prowadzi do hipoplazji [29]. Obserwowano też liczne okołonaczyniowe nacieki limfocytarne w wielu narządach, między innymi w nerkach, sercu, oponach mózgowych oraz w płucach. Pacjenci mogą wykazywać objawy, sugerujące zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (w Europie nie odnotowane). Objawy ze strony układu oddechowego manifestują się suchym kaszlem i atypowym zapaleniem płuc, a u osób dorosłych naciekami płucnymi [48].

W Europie jako powikłania zakażenia *A. phagocytophilum* najczęściej obserwowano zawroty głowy [13, 74], jedno lub dwustronne porażenie twarzy [50], zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS) [48], rozpad mięśni prądkowanych [24] oraz ciężkie zakażenia oportunistyczne i szpitalne. Wśród zakażeń oportunistycznych stwierdzano zapalenie przełyku wywołane przez *Candida* spp. oraz *Herpes* spp., zapalenie płuc wywołane przez *Cryptococcus* spp. i *Aspergillus* spp. [8, 11, 46].

W USA jako powikłania zakażenia częściej stwierdzano ponadto: posocznicopodobne zespoły wykrzepiania wewnątrznaczyniowego [8], neuropatię obwodową [9], bóle splotów płucnych, zapalenie mięśnia sercowego [46], wysięk osierdziowy, a przypadki wysypki skórnej stwierdzano u 11% pacjentów [7]. W Europie u większości pacjentów nie stwierdza się objawów skórnych.

Pamiętać jednak należy o możliwości występowania współzakażenia innymi chorobotwórczymi czynnikami

odkleszczowymi i występowaniu w związku z tym objawów mieszanych.

W przypadku zakażenia *Anaplasma phagocytophilum* może dochodzić do reinfekcji [39]. Nie ma danych dotyczących występowania HA jako choroby przewlekłej [9]. Dumler jednak sugeruje, że anaplazmoza może przybierać postać przewlekłą, powodować upośledzenie procesów obronnych gospodarza i hamować odpowiedź immunologiczną [27].

W Europie nie zanotowano przypadków śmiertelnych spowodowanych zakażeniem *A. phagocytophilum*. W Stanach Zjednoczonych większość przypadków śmiertelnych HA była związana z zakażeniem podczas stosowania immunosupresji czy współistnienia innej podstawowej choroby [8, 9, 11]. Śmiertelność choroby wynosi do 5% [13]. U osób zmarłych z rozpoznaną HA dominowały oportunistyczne zakażenia grzybicze i wirusowe [78].

6.1.2. Ehrlichioza (HME). Pierwszy przypadek zakażenia człowieka przez *Ehrlichia chaffeensis* opisano i udokumentowano w 1986 roku w Stanach Zjednoczonych u pacjentów z ciężką chorobą gorączkową po ukąszeniu kleszczy [53].

Pierwszy w Europie zdiagnozowany i udokumentowany przypadek *E. chaffeensis* miał miejsce w Portugalii w 1991 roku [57]. W Europie zanotowano zaledwie kilka przypadków HME (human monocytic ehrlichiosis). Mimo braku potwierdzonych przypadków klinicznych niektórzy badacze znajdują u ludzi przeciwciała przeciwko *E. chaffeensis*.

Czynnikiem wywołującym ludzką jak i psią monocytarną ehrlichiozę jest *E. chaffeensis*, wykazująca monocytotropowość. Występowanie przypadków choroby koreluje z występowaniem wektorów – kleszczy *Amblyomma americanum* i *Dermacentor variabilis*. Najwięcej przypadków stwierdzono w USA (około 750 potwierdzonych przypadków), w Europie są to przypadki sporadyczne. Badania osób z wysokim ryzykiem ekspozycji na kleszcze wykazują, że około 75% serokonwersji przeciwciał swoistych dla *E. chaffeensis* przebiegało subklinicznie [29, 32]. Średni okres inkubacji dla *E. chaffeensis* wynosił 9 dni, a 2 z 3 pacjentów stanowili mężczyźni, średni wiek badanych wynosił 44 lata [32]. Osoby z typową HME wykazują wysoką gorączkę (97%), bóle głowy (81%), złe samopoczucie (84%), bóle mięśni (68%) i zwykle bez innych charakterystycznych objawów. Rzadko występują objawy: żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty, biegunka); ze strony układu oddechowego (kaszel, nacieki płucne) i bóle stawowe. Opisano także zajęcie o.u.n. (sztywność karku, dezorientacja) oraz zapalenie opon mózgowych [72]. Wysypka stwierdzana jest tylko u 36% pacjentów. Mimo niespecyficznych objawów klinicznych, dodatnie wyniki laboratoryjne występują u 86% pacjentów.

Stwierdza się limfopenię i neutropenię (60–74%), trombocytopenię (72%) i wzrost aktywności transaminazy asparaginianowej (86–88%). Powikłania obejmują: zespół podobny do wstrząsu toksycznego z niewydolnością wielonarządową, zapalenie opon i mózgu, rozsiane uszkodzenie pęcherzyków płucnych z zespołem ostrego wyczerpania oddechowego dorosłych oraz piorunujące zakażenia u pacjentów z upośledzoną odpornością (zakażonych HIV, przyjmujących duże dawki kortykosteroidów, po transplantacji narządów) [2, 29]. Współczynnik umieralności wynoszący ok. 2–3% byłby wyższy, gdyby nie efektywna terapia antybiotykowa.

6.1.3. Sennetsu Ehrlichioza (SE). Nazwana pochodzi od japońskiego terminu określającego mononukleozę zakaźną. *N. sennetsu* po raz pierwszy była wyizolowana w 1953 r. od pacjentów podejrzanych o mononukleozę [2]. Obecnie rzadko identyfikowana. U pacjentów rozwija się samo ustępująca choroba gorączkowa z dreszczami, bólem głowy, złym samopoczuciem, owrzodzeniem krtani, anoreksją i uogólnionym powiększeniem węzłów chłonnych (limfadenopatią). Przypadki były stwierdzane tylko w Japonii i prawdopodobnie Malezji. Wyniki laboratoryjne wykazują wczesną leukopenię oraz atypowe limfocyty krwi obwodowej w okresie wczesnej rekonwalescencji. Zgonów i ciężkich powikłań nie stwierdzano.

6.1.4. Inne ludzkie ehrlichiozy. W 1996 r. od osób bezobjawowych, posiadających w monocytach krwi obwodowej morule wyizolowano czynnik przypominający *E. canis*. Serologiczne badania dzieci z chorobami gorączkowymi i zdrowych dorosłych, którzy mieli kontakt z psami chorymi na psią ehrlichiozę w Wenezueli wykazały u dwóch zdrowych osób przeciwciała swoiste dla czynnika wenezuelskiej ludzkiej ehrlichiozy, *E. chaffeensis*, *E. canis* i *E. muris*. Porównanie genu 16S rRNA czynnika ludzkiej wenezuelskiej ehrlichiozy z dwoma szczepami psiej ehrlichiozy wykazało 2 zasadnicze różnice [2]. Czynnik powodujący psią granulocytarną ehrlichiozę, *E. ewingii* stwierdzony był również u 4 osób w Missouri. U trzech z czterech pacjentów poddawanych terapii immunosupresyjnej stwierdzono kliniczne i laboratoryjne cechy HME. U 2 z 4 stwierdzono wtręty w obwodowych granulocytach, a PCR z krwi przy użyciu starterów 16SrRNA wykazał sekwencje DNA *E. ewingii*.

Mimo, że *Wolbachia* spp. nie są bezpośrednimi patogenami ludzi czy zwierząt, dane eksperymentalne wykazują potencjalnie niebezpieczną rolę tych wewnątrzkomórkowych bakteryjnych pasożytów nicieni (*Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*) w powstawaniu reakcji zapalnych u gospodarzy. *Wolbachia* spp są poważnie brane pod uwagę jako czynnik patogenezy zakażeń pasożytniczych [75].

6.2. Zakażenia u zwierząt

Gatunki rodzajów *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* i *Aegyptianella* i spokrewnione z nimi rodzaje jako weterynaryjne patogeny były znane długo przed ich rozpoznaniem jako ludzkie. Dzięki wcześniejszej ogromnej pracy mikrobiologów weterynaryjnych możliwe było zidentyfikowanie i lepsze zrozumienie chorób wywoływanych przez te drobnoustroje u ludzi.

6.2.1. Ehrlichiozy u psów. Psie monocytarne ehrlichiozy (CME, canine monocytic ehrlichiosis) wywołane przez *E. canis* jako pierwsze opisano w Algierii w 1935 roku, a następnie w innych obszarach świata [66]. Były przyczyną śmiertelnej choroby psów armii amerykańskiej podczas konfliktu w Wietnamie. Choroba miała ostrą, subkliniczną i chroniczną fazę. Stwierdzano leukopenię, trombocytopenię i hiper-gammaglobulinemię. *E. ewingii* wywołująca psią granulocytarną ehrlichiozę (CGE, canine granulocytic ehrlichiosis), zwykle łagodniejsza niż CME jest czasami powiązana z reumatoidalnym zapaleniem stawów [2]. W przeciwieństwie do *E. canis*, *E. ewingii* nie wyhodowano jeszcze *in vitro*. Zanotowano również przypadki CGE wywołane przez *A. phagocytophilum* [2]. *A. platys* jest trombocytotropową bakterią wywołującą łagodną cykliczną gorączkę i trombocytopenię u psów. Często stwierdzano obecność moruli [66].

6.2.2. Ehrlichiozy u koni. Gorączka końska jest żołądkowo-jelitową chorobą koni wywołaną przez zakażającą monocytę *N. risticii*. Choroba ta występuje w różnych geograficznych obszarach Europy i północnych rejonach Stanów Zjednoczonych. Objawia się depresją, anoreksją, letargiem, gorączką, kolką, wodnistą biegunką, odwodnieniem, leukopenią. Transmisja wymaga wodnego ekosystemu, w którym owady mogą się namażać [2]. Końska granulocytarna ehrlichioza wywołana przez *A. phagocytophilum* (poprzednio *E. equi*), jest sezonową chorobą. Po raz pierwszy opisana została w 1969 roku. Choroba występuje w Europie i Stanach Zjednoczonych. Jest samoustępująca, podobna do ludzkiej anaplazmozy i wydają się być przenoszona poprzez ukąszenia kleszczy [2].

6.2.3. Anaplazmozy u przeżuwaczy. Kleszczowa gorączka przeżuwaczy jest wywołana przez granulocytotropowe *A. phagocytophilum* (poprzednio *E. phagocytophila*) i jest przenoszona w Europie przez ukłucia zakażonych kleszczy *I. ricinus* [2]. Najczęściej rozprzestrzenianej przez kleszcze wśród bydła na całym świecie etiologicznym czynnikiem bydłowej anaplazmozy jest *A. marginalne*. Możliwa jest również transmisja poprzez ukąszenia much i innych owadów. Organizmy rozwijają się jako wewnątrzery-

trocytarne inkluzje i mogą wywoływać ostre anemie, utratę masy, poronienia, a czasami śmierć. Cechą tego zakażenia jest niski równomierny poziom bakteriemii po ustąpieniu objawów klinicznych, dlatego też zakażone zwierzęta stanowią rezerwuar drobnoustrojów. Cecha ta jest wspólna dla zakażeń *A. phagocytophilum* jeleniowatych i zakażeń *A. platys* u psów.

6.2.4. Kowdrioza. *Ehrlichia (Cowdria) ruminantium* jest wewnątrzkomórkową bakterią zakażającą neutrofile i komórki śródbłonna bydła, kóz oraz owiec [66]. Kowdrioza jest ostrą chorobą z wysokim współczynnikiem śmiertelności sięgającym 90%. Występuje najczęściej w Afryce oraz na wyspach Oceanu Atlantyckiego, Indyjskiego i Morza Karaibskiego.

6.2.5. Neorickettsioza u psów. *N. helminthoeca*, czynnik wywołujący chorobę łososi, zakaża komórki jednojądrowe, nabywany przez psy po zjedzeniu łososi [66]. Za pomocą molekularnej i antygenowej analizy ustaliła ściśle powiązania pomiędzy *N. helminthoeca*, *N. risticii* i *N. sennetsu*. Podobieństwo występuje również w sposobach ich transmisji.

6.2.6. Zakażenia *Wolbachia* spp. Odkryta w 1924 r. w układzie rozrodczym komara dopiero ostatnio wzbudziła duże zainteresowanie badaczy. Niezwykłą cechą *Wolbachii* jest wybiórcze mordowanie zakażonych osobników płci męskiej, wyzwalanie zdolności do dzieworództwa u samic oraz zamiana „chłopców na dziewczynki”. Drobnoustroje bytują w komórkach rozrodczych stawonogów, m.in. owadów, pajaków i skorupiaków. Około 20% gatunków stawonogów jest ofiarą pro-feministycznej infekcji. Dotychczas nie stwierdzono zakażeń u ludzi. Bakterie rozprzestrzeniają się tylko w linii żeńskiej – transowarialnie. U samic zabijają męskie embriony (u biedronek) lub sprawiają, by embriony stały się niewrażliwe na męskie hormony. Zakażone samce stanowią ślepią uliczkę, ponieważ nie może dojść do przeniesienia zakażenia na potomstwo ze względu na brak cytoplazmy w plemnikach. Kontakt z *Wolbachia* dla samców ma poważne następstwa – giną albo zamieniają się w samice. Bakteria jest niezbędna do życia pasożytom wywołującym u ludzi filariozę oraz onchocerkozę (ślepotę rzeczną) [2, 28, 74].

7. Diagnostyka *Anaplasma phagocytophilum*

Identyfikacja i potwierdzanie zakażeń wywołanych przez *A. phagocytophilum* wymaga starannego wywiadu, badania fizykalnego i wyników laboratoryjnych potwierdzających diagnozę. Anaplazmoza powinna być podejrzana u wcześniej zdrowych osób,

u których rozwinęły się objawy takie jak gorączka, leukopenia, trombocytopenia oraz podniesiony poziom transaminaz, jak też brak odpowiedzi na leczenie antybiotykami β -laktamowymi czy makrolidami szczególnie u pacjentów z obszarów endemicznych [6, 16, 58, 59]. Diagnostyka koncentruje się na określaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej oraz jeśli to możliwe na wykrywaniu drobnoustroju. Na podstawie prawidłowych parametrów analitycznych nie należy wykluczać choroby. Rozpoznanie opiera się przede wszystkim na teście serologicznym, immunofluorescencji pośredniej. W przypadku podejrzenia HA, próbki krwi powinny być również ocenione na podstawie ręcznego zliczania krwinek białych (ocena morfologiczna w celu ewentualnego stwierdzenia morul) [6]. Identyfikacje morul uzyskuje się poprzez zabarwienie preparatu metodą Giemzy. Test wykrywający morule charakteryzuje się wysoką specyficnością, ale niską czułością. Obecność moruli w rozmazie krwi lub rozmazie szpiku jest dowodem na obecność zakażenia *A. phagocytophilum* [8, 11]. U pacjentów w ostrej fazie choroby morule stwierdzano w 25–68% przypadków [3, 11, 40]. W rozmazach krwi są zwykle wykrywane tylko w ciągu ostrego stadium choroby [3, 11]. Obecność morul koreluje z wiekiem pacjentów i pozytywną reakcją PCR [3]. W ocenie preparatów istotne jest doświadczenie analityka. Fałszywie dodatnie wyniki można uzyskać z powodu obserwacji toksycznych ziarnistości (hipergranulacja) czy ciałek Dohlego.

Centrum Prewencji i Kontroli Chorób w Atlancie (CDC) ustaliło w 1997 definicję przypadku HA [20], która jest wciąż korygowana [23]. Anaplazmoza definiowana jest jako ostra choroba gorączkowa, potwierdzona przynajmniej jednym z laboratoryjnych kryteriów:

1. Serokonwersja (minimum 4-krotny wzrost poziomu przeciwciał w próbie IFA). Aby uznać pacjenta za chorego na anaplazmozę, minimalny poziom przeciwciał musi wynosić 64 w ostrej fazie choroby i być 4-krotnie wyższy w fazie rekonwalescencji. Dlatego też krew pobieramy od pacjenta 2-krotnie w fazie ostrej (w 3 dni choroby) i drugi raz w fazie rekonwalescencji (14 dni choroby). Dla pełnego zobrazowania przebiegu choroby pobiera się również krew od osób w 3 lub 4 miesiącu po ustąpieniu objawów.
2. Pozytywny wynik reakcji PCR z gatunkowo specyficznymi starterami.
3. Obecność moruli w leukocytach krwi lub młodszych ich formach z pozytywnym wynikiem wykrycia przeciwciał swoistych dla *A. phagocytophilum* testem IFA (opartym na poziomie referencyjnym miana wyznaczonym przez laboratorium).
4. Immunochemiczne wybarwienie antygeny *A. phagocytophilum* w materiale z biopsji czy autopsji
5. Hodowla *A. phagocytophilum* z materiału klinicznego.

Grupa ekspertów uściśliła definicję dokonując klasyfikacji przypadków ludzkiej anaplazmozy na możliwe, prawdopodobne i potwierdzone [7, 22]

1. Przypadki możliwe, jeśli stwierdzono ukłucie przez kleszcza i niespecyficzne objawy grypopodobne.
2. Przypadki prawdopodobne, jeśli stwierdzono powyższe kryteria, potwierdzone pojedynczym pozytywnym wynikiem testu IFA (opartym na poziomie referencyjnym miana wyznaczonym przez laboratorium np. 1:80) lub obecnością morul w leukocytach czy pozytywnym PCR [2, 3, 22].
3. Przypadki potwierdzone, wykazujące powyższe kryteria, potwierdzone laboratoryjnie przez 4-krotny wzrost miana swoistych przeciwciał, pozytywną reakcję PCR z dwóch izolacji oraz wykrycie morul [22] czy też pozytywną hodowlę.

W diagnostyce różnicowej anaplazmozy uwzględnić należy inne choroby przenoszone przez kleszcze m.in. boreliozę, babesiozę, KZM, tularemie, a ponadto grypę, zakażenia układu pokarmowego, leptospirozę, zapalenie wątroby, zapalenie wsierdza, białaczkę. W rejonach endemicznych dla boreliozy powinno się przeprowadzać równocześnie diagnostykę anaplazmy ze względu na możliwość równoczesnej transmisji patogenów przez tego samego kleszcza. Badania przeprowadzone przez Skotarczak i wsp. potwierdzają współwystępowanie patogenów u kleszczy [31, 68, 71], najczęściej dwóch, a niekiedy nawet kilku jednocześnie (np. *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, *B. microti*) [68, 70].

7.1. Hodowla

Ostatecznym i niepodważalnym potwierdzeniem obecności aktywnej anaplazmozy jest uzyskanie hodowli patogena. Niestety jest ona bardzo trudna do przeprowadzenia. Polega na zakażeniu laboratoryjnych linii komórkowych materiałem pobranym od pacjenta. Hodowla pokazuje szybki postęp zmian cytopatycznych w komórkach i pozwala na bezpośrednią obserwację *A. phagocytophilum* od 5 do 12 dnia po założeniu inokulum. Hsieh i wsp. badając komórki HL-60 zakażone czynnikiem HGE wykazali, że cytopatyczne właściwości patogenu wynikają z jego zdolności do indukowania apoptozy [43]. Horowitz i wsp. porównali objawy kliniczne i wyniki laboratoryjne pacjentów ze stwierdzoną HA, u których wyhodowano oraz nie wyhodowano drobnoustrojów [40]. Zaobserwowano, że hodowlę częściej uzyskiwano od osób starszych ze statystycznie wyższą temperaturą ciała i wyższym poziomem swoistych przeciwciał. Wadą metody są duże wymagania hodowlane oraz konieczność dalszej identyfikacji. Dotychczas żaden europejski przypadek nie został potwierdzony metodą hodowli.

7.2. Testy serologiczne

Do diagnostyki HA w laboratoriach diagnostycznych standardowo używane są testy serologiczne takie jak: pośrednia immunofluorescencja (IFA), immunoblotting, ELISA. Wadą tych metod jest ich wysoki koszt i zróżnicowanie otrzymywanych wyników związane z używaniem antygenów z różnych szczepów namnażanych w zwierzętach (konie) czy liniach komórkowych HL-60. Dawniej w większości testów serologicznych wykorzystywano *E. phagocytophila*, *E. equi* i czynnik HGE otrzymywane z eksperymentalnie zakażanych neutrofilów izolowanych z krwi [2, 8, 26]. Obecnie w metodach stosuje się ludzkie izolaty rozwijające się w ludzkich liniach komórek promielocytarnych – HL60 [2, 3]. Widoczne jest wyraźne zróżnicowanie antygenowe izolatów *A. phagocytophilum*, lecz jest mało prawdopodobne aby to zróżnicowanie miało wpływ na różny obraz kliniczny choroby [2, 75].

7.2.1. IFA. W laboratoriach diagnostycznych w celu określenia miana przeciwciał w surowicy stosowany jest standardowo test IFA (immunofluorescencji pośredniej). Wynik IFA powinien być interpretowany w kontekście objawów klinicznych, czasowej odpowiedzi immunologicznej, stanu immunologicznego pacjenta i efektu wcześniejszego leczenia antybiotykami. Dlatego czułość testu IFA dla zakażenia *A. phagocytophilum* jest trudna do oceny. Wong i wsp. oceniając technikę IFA podają, że najlepszą czułość uzyskuje się w diagnostyce HA stosując jako antygen *E. equi* [80]. IFA aktualnie nie jest wystandaryzowana. Pomimo tego metoda ta wydaje się być najlepsza z dostępnych. Przypadki stwierdzone w Europie wykazały pozytywne wyniki serologiczne w 80% zachorowań. W Stanach Zjednoczonych wśród pacjentów z potwierdzoną HA wszyscy badani z wyjątkiem jednego (99,2%) wykazywali wyniki dodatnie w pierwszym miesiącu po zakażeniu, spośród których 98,7% wykazywało swoiste przeciwciała przez kolejne 6 miesięcy. Po 42 miesiącach od zakażenia wyniki dodatnie otrzymano jeszcze u 7,3% pacjentów.

Surowice powinny być badane w obydwu klasach przeciwciał (IgG oraz IgM) przy początkowym rozcieńczeniu 1:64 lub 1:80. Jeżeli próbka reaguje pozytywnie w rozcieńczeniu początkowym, należy sporządzić seryjne dwukrotne rozcieńczenia w celu oznaczenia końcowego rozcieńczenia dającego reakcję pozytywną (miana).

U 25 do 45% osób zakażonych stwierdza się swoiste przeciwciała [1, 2, 3]. Należy jednak pamiętać, że kilkanaście procent zdrowej populacji żyjącej na terenach wysoko endemicznych będzie również posiadało swoiste przeciwciała. Powoduje to, że jednokrotne lub wczesne badania serologiczne są mniej użyteczne [2].

Typową odpowiedzią podczas ostrej fazy zakażenia jest szybki wzrost poziomów przeciwciał (w ciągu 2 tygodni) do osiągnięcia wysokiego miana końcowego w ciągu pierwszego miesiąca $\geq 1:640$ [4]. U pacjentów leczonych z rozpoznaną HA (potwierdzoną hodowlą) miana przeciwciał spadały stopniowo przez kilka miesięcy, a po okresie 1 roku po zakażeniu swoiste przeciwciała wykrywane były u około połowy pacjentów [4].

Wiarygodność testów serologicznych jest wysoka, ponieważ wyniki testów wykazują dobrą korelację z innymi metodami [2, 3, 4]. W grupie 24 pacjentów z HA potwierdzoną przez hodowlę czułość wynosiła 91,3% [4], a średnia czułość IFA w grupie 28 osób z pozytywną hodowlą, PCR lub obecnością morulu w rozmazie krwi wynosiła 95%. Oznaczenia przeciwciał w klasie IgM wydają się być przydatne dla określania aktualnego zakażenia, aczkolwiek czułość może nie być tak wysoka jak w przypadku IgG [76].

Badania serologiczne mogą wykazywać fałszywie dodatnie wyniki ze względu na możliwe reakcje krzyżowe [30, 67, 74, 81], szczególnie podczas współwystępowania [68, 71]. Ponadto pacjenci z niedoborem odporności, łącznie z zaawansowanym AIDS, do kilku tygodni po infekcji posiadają przeciwciała o niskim powinowactwie. U niektórych pacjentów po ostrej fazie choroby przeciwciała mogą się utrzymywać przez kilka lat.

Obserwowano reakcje krzyżowe w teście IFA między *A. phagocytophilum* i *E. chaffeensis*. W tym przypadku wyniki wykazywały wyższe miano z powodu homologicznych antygenów [2, 3].

Fałszywie dodatnie reakcje były również obserwowane u pacjentów z innymi riketsjozami, gorączką Q, zakażeniami wirusem Epstein-Barr, a także przy obecności autoprzeciwciał antyleukocytarnych (np. anty-płytkowych) [2].

7.2.2. Immunoblotting. Podczas rozwoju zakażenia HA większość pacjentów wytwarza przeciwciała skierowane przeciwko rodzinie białek błonowych HGE-44 o masie cząst. 42–49 kDa. Białka te są kodowane przez geny, które posiadają wysoki stopień nukleotydowego podobieństwa w konserwatywnych częściach sekwencji genu. Ze względu na te właściwości są dobrymi kandydatami do wykorzystania ich w celach diagnostycznych. W metodzie immunoblottingu wykorzystuje się te rekombinowane immunodominujące antygeny *A. phagocytophilum*. [2]. Dobre wyniki różnicowania zakażeń między *A. phagocytophilum* i *E. chaffeensis* uzyskuje się przez określanie obecności w surowicy pacjentów jednego z głównych antygenów *A. phagocytophilum* białka o masie około 44 kDa, określanego jako białko wiążące maltozę – MBP (maltose-binding protein) [2, 26]. Immunoblotting

wydaje się być najlepszą metodą różnicującą zakażenia, a w połączeniu z testem IFA pozwala uzyskać bardzo dobre rezultaty.

7.2.3. ELISA. Obecnie prowadzone są badania nad wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych z użyciem rekombinowanych antygenów *A. phagocytophilum*. Wprowadzenie ich na rynek wiązało by się z poprawą diagnostyki anaplazmozy. Na ten rodzaj testów czekają rutynowe laboratoria diagnostyczne. I j d o i wsp. [44] jako antygeny użyli w teście ELISA białka rekombinowanego HGE-44. U 33 pacjentów z HGE potwierdzoną immunoblottingiem wykryto przeciwciała uzyskując czułość 87%, podczas gdy u osób z innymi chorobami, takimi jak: borelioza z Lyme, HME, reumatoidalne zapalenie stawów oraz kiła uzyskano wyniki ujemne (za wyjątkiem jednego przypadku), otrzymując swoistość 98%.

Zastosowanie rekombinowanego antygeny HGE-44 w testach ELISA może zredukować koszty i różnice w wynikach uzyskanych różnymi metodami oraz umożliwić przegląd dużej liczby surowic pacjentów. Autorzy twierdzą, że test ELISA HGE-44-MBP jest odpowiedni zarówno dla uzyskania laboratoryjnej diagnozy jak i dla badań epidemiologicznych HA.

7.3. Diagnostyka molekularna

Ponieważ koewolucja bakterii, wektora i gospodarza przebiegała niezależnie na kontynentach Amerykańskim oraz Europejskim, można spodziewać się istotnych różnic w charakterystyce szczepów, zarówno genetycznych jak i fenotypowych, takich jak: profil antygenowy, preferencje gospodarza oraz wirulencja [12].

W celu badania pleomorfizmu genetycznego i antygenowego blisko spokrewnionych gatunków drobnoustrojów najlepsze wyniki otrzymuje się analizując najbardziej zmienne geny. Analiza genów 16S rRNA jest niewystarczająca, aby można było na jej podstawie różnicować szczepy z Ameryki Północnej i Europy. Gen 16S rRNA jest zbyt konserwatywny (niezmienny).

Dobre wyniki analizy różnic genetycznych otrzymano wykorzystując do tego celu gen *ankA* kodujący 166 kDa antygen białka cytoplazmatycznego, który dobrze uzupełnia informację otrzymaną z analizy genu 16S rRNA. Analiza tego genu z różnych rejonów geograficznych z uwzględnieniem rodzajów zakażanych granulocytów pozwoliła na podział *A. phagocytophilum* na trzy różne podgatunki: północnowschodni US, środkowowschodni US i europejski [25, 54]. Niektóre ze stwierdzonych różnic mogą mieć zastosowanie w opracowaniu metod diagnostycznych i zrozumieniu różnic w wirulencji drobnoustrojów jak i w doborze gospodarza.

Dotychczas gen *groEL* był wykorzystywany w celu szybkiej identyfikacji: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bartonella*, *Mycobacterium* i *Ehrlichia* metodą hybrydyzacji i PCR-RFLP. Gen *groEL*, który koduje białko szoku termicznego GroEL o masie 60 kDa, jest obecny zarówno u prokariota jak i eukariota. Koduje wysoko konserwatywne białko, które jest istotne dla życia komórek. Geny *groEL* wykorzystywane są do ustalania pokrewieństwa ewolucyjnego u eubacterii.

Przeprowadzona analiza genów *groESL* i *ankA* [25, 51, 54] wydaje się potwierdzać większą różnorodność wśród szczepów europejskich, co koreluje z większą różnorodnością genetyczną zwierząt europejskich. Metody genetyczne, które dotychczas znalazły zastosowanie to: łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR, Polymerase Chain Reaction) w diagnostyce rutynowej oraz elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis) i typowanie przez sekwencjonowanie wybranych genów (MLST, Multilocus System Typing) w badaniach epidemiologicznych.

7.3.1. PCR. Pod koniec lat 80-tych nastąpił przełom w wykrywaniu zakażeń dzięki wykorzystaniu w laboratoriach metody PCR. Również w przypadku diagnostyki *A. phagocytophilum* metoda ta znalazła duże zastosowanie. Amplifikacja genu 16S rRNA *A. phagocytophilum* zaraz po metodach serologicznych jest najczęściej używaną metodą potwierdzania zakażenia. Ma ona szerokie zastosowanie gdyż może służyć do detekcji i identyfikacji drobnoustrojów w próbkach krwi pacjentów, bioptatach skóry, a także u samych kleszczy [45, 55].

PCR był wykorzystany jako narzędzie diagnostyczne w 73% przypadków stwierdzonych w Europie. W 4 przypadkach (27%) serologicznie pozytywnych wynik reakcji PCR był negatywny, tak więc negatywne wyniki PCR nie mogą stanowić podstawy do wykluczenia anaplazmozy [3, 11, 40, 59].

7.3.2. PFGE. W nowym podziale taksonomicznym wyróżniono jeden gatunek *Anaplasma phagocytophilum*, mimo jego heterogenności biologicznej i klinicznej. W zależności od lokalizacji geograficznej spotyka się różnice w zapadalności i obrazie klinicznym infekcji u różnych gospodarzy [1, 10]. Badania genomowego DNA metodą PFGE [25] przeprowadzono na izolatach od ludzi, koni i bydła z Ameryki Północnej. Użyte enzymy restrykcyjne *AscI*, *EagI*, *PmeI*, *SwaI* i *SgfI* dały powtarzalne produkty od 3 do 11 prążków. Każdy izolat miał identyczny wzór PFGE dla każdego enzymu. Badania te potwierdzają rozmiar genomu *A. phagocytophilum* tak jak i wysoki stopień podobieństwa wśród szczepów występujących w Ame-

ryce Północnej. Mimo, że badaniami objęto ograniczone regiony genomu, jest interesujące, że nie ma różnic w rozmiarze genomu ani wzorach cięcia enzymami restrykcyjnymi, nawet pomiędzy izolatami z przeciwległych części kontynentu. Analiza ta pokazała ponadto, że północno-amerykańskie izolaty *A. phagocytophilum* są mniej heterogenne oraz że różnią się one od szczepów europejskich.

7.3.3. MLST. Metoda MLST należy do nowoczesnych metod molekularnych. Polega ona na analizie sekwencji nukleotydowych fragmentów DNA różnych genów (np. genów podstawowego metabolizmu komórki). Metoda MLST w przeciwieństwie do metody PFGE wykrywa zmiany stosunkowo wolno akumulujące się w genomie. Ze względu na zdolność wychwytywania nawet odleglejszych pokrewieństw między izolatami może być z powodzeniem stosowana do wykrywania szczepów oraz do monitorowania ich globalnego rozprzestrzeniania się. Wyniki uzyskiwane przy użyciu metody MLST są jednoznaczne i można je wykorzystywać do porównywania z danymi pochodzącymi z różnych laboratoriów na całym świecie. Istotne byłoby porównanie tą metodą szczepów izolowanych w Europie ze szczepami z Ameryki Północnej.

7. Leczenie

Dla gatunków *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp. testy wrażliwości na antybiotyki nie są rutynowo wykonywane. Spowodowane jest to brakiem możliwości lub dużymi trudnościami w uzyskaniu hodowli jak i długim czasem oczekiwania na wynik.

Decyzja o leczeniu powinna być oparta na objawach klinicznych i danych epidemiologicznych. Nie powinna być nigdy opóźniana z powodu oczekiwania na wynik laboratoryjny. Opóźnienie lub zastosowanie niewłaściwej terapii może prowadzić do ciężkiego przebiegu choroby i powikłań, a nawet śmierci pacjenta, szczególnie w przypadku osób starszych. Znaczną aktywność w stosunku do *Anaplasma phagocytophilum* wykazują antybiotyki takie jak doksycyklina, rifampicyna i fluorochinolony, natomiast jest ona oporna na klindamycynę, trimetoprim-sulfametoksazol, imipenem, a również na ampicylinę, amoksycylinę, ceftriakson, erytromycynę, klarytromycynę. Chloramfenikol i gentamycyna wykazują słabą aktywność przeciwko *A. phagocytophilum* i nie powinny być stosowane [56]. Tetracykliny są lekami z wyboru do leczenia pacjentów z HA, szczególnie dla dzieci starszych (powyżej 12 lat) i dorosłych. U dorosłych stosuje się ją w dawce 500 mg 4×dz. p.o. Doksycyklinę stosuje się u dorosłych w dawce 100 mg dwa razy dziennie, a u dzieci w dawce 3 mg/kg/24 h przez 7 do

10 dni. Ze względu na możliwość współzakażenia z *B. burgdorferi*, a także często braku swoistych dla *A. phagocytophilum* objawów niektórzy uważają, że podanie doksycykliny jest postępowaniem z wyboru, bowiem antybiotyk ten pokrywa swoim spektrum aktywności obydwie drobnoustroje.

W przypadkach nietolerancji doksycykliny jak i do leczenia dzieci młodszych niż 12 lat (potencjalne odbarwianie zębów), pacjentów ze schorzeniami alergicznymi, pacjentów z nietolerancją żołądkową oraz kobiet w ciąży wskazana jest rifampicyna i chinolony. Maurin i wsp. [?.] przeprowadzili badania wrażliwości na antybiotyki dla 8 szczepów *Anaplasma phagocytophilum* z USA, które także potwierdzają, że doksycyklina, rifampicyna i lewofloksacyna są najbardziej aktywnymi antybiotykami *in vitro* wobec tych szczepów. Rifampicyna *in vivo* nigdy nie jest stosowana w monoterapii. Symptomy ustępują w ciągu 24–48 godzin od rozpoczęcia leczenia. W przypadku braku odpowiedzi na leczenie powinna być rozpatrywana inna diagnoza. [41, 50].

9. Prewencja

Najlepszą metodą zapobiegania anaplazmozie i innym chorobom odkleszczowym jest ograniczenie transmisji, a więc unikanie ekspozycji na kleszcze. Stosowanie odpowiedniego ubioru zabezpieczającego przed kleszczami, używanie chemicznych środków odstraszających znacznie redukuje ryzyko ataku kleszczy, a tym samym zakażenia chorobami odkleszczowymi [52, 81]. Do zakażenia *A. phagocytophilum* może dochodzić w ciągu pierwszych godzin żerowania kleszcza, dlatego po każdym pobycie w miejscach potencjalnie zagrożonych występowaniem kleszczy należy oglądać dokładnie całe ciało i natychmiast usunąć kleszcza. Badanie stopnia zakażenia kleszczy na danym terenie i świadomość mieszkańców o potencjalnym zagrożeniu z ich strony powinny pozytywnie wpływać na profilaktykę chorób odkleszczowych [17].

Ze względu na wysoką skuteczność leczenia antybiotykami, nie istnieje zapotrzebowanie na szczepionkę przeciwko anaplazmozie. Ponadto, byłaby ona trudna do otrzymania gdyż wykazano, że przebycie choroby nie powoduje wytworzenia odporności. Psy, które przebyły ostrą anaplazmozę były ponownie wrażliwe na zakażenie [35].

10. Badania w Polsce

Mimo, iż anaplazmoza jest jednostką chorobową diagnozowaną od niedawna, a przypadki jej występowania w Polsce są raczej sporadyczne, zainteresowanie

środowiska naukowego zajmującego się zoonozami jest stosunkowo duże.

Pierwsze trzy przypadki ostrej HGE w Polsce zostały opisane przez Ty le w s k ą - W i e r z b a n o w s k ą i wsp. [74] w roku 2001. Rozpoznanie przeprowadzono na podstawie IFA i reakcji PCR. Sprawdzono obecność morul w preparacie krwi. Opierając się na kryteriach CDC [20] wszystkie trzy przypadki zostały sklasyfikowane jako HGE. Używając kryteriów rekomendowanych przez grupę ekspertów [22, 82] dwa przypadki zostały rozpoznane jako HGE, a jeden jako prawdopodobne HGE.

Badania przeprowadzane przez G r z e s z c z u k i wsp. [36] potwierdziły występowanie anaplazmy w ekosystemie endemicznym dla *Ixodes ricinus*, jakim jest Białowiecki Park Narodowy. U badanych osób pozytywny wynik serologiczny stwierdzono u 6,2% (8/130). Nie znaleziono powiązań pomiędzy pozytywnym wynikiem IFA, a ugryzieniem przez kleszcze jak również wykonywaną pracą na terenach zagrożonych. Zauważono większe prawdopodobieństwo występowania przeciwciał anti-HGE u osób, u których zdiagnozowano boreliozę. U dorosłych kleszczy czynnik HGE był obecny w 19,5% (59/302) przypadków i u nimf w 1,4% (1/74). U 16,7% (10/59) kleszczy zakażonych czynnikiem HGE stwierdzono współzakażenie *Borrelia burgdorferi*.

Ocenę częstości występowania swoistych przeciwciał przeciwko czynnikowi HGE u pracowników eksploatacji lasów w powiecie zamojskim przedstawili C h m i e l e w s k a - B a d o r a i wsp. [21] Wyniki dodatnie uzyskano dla 21,5% z grupy badanej. Osoby pracujące fizycznie częściej wykazywały wyniki dodatnie niż osoby wykonujące pracę biurową. W grupie kontrolnej wynik seropozytywny stwierdzono tylko w 5,3%. Uzyskane wyniki wskazują na obecność anaplazmy na obszarach wiejskich oraz na potrzebę przeprowadzenia badań opisujących częstości zakażenia kleszczy na tym terenie.

B u k o w s k a i wsp. [18] określili występowanie swoistych przeciwciał dla czynnika HGE i *Babesia microti* u żołnierzy służby zasadniczej stacjonujących w północno-wschodniej Polsce. Wyniki otrzymane stwierdzają występowanie HA na poziomie 16,2% (23/142) przed ekspozycją na kleszcze i wzrost po potencjalnej ekspozycji do 23,9% (34/142).

Badania przeprowadzone przez F o t a - M a r k o w s k ą i wsp. [33] oceniły częstość występowania przeciwciał przeciw czynnikiem HGE i krętków *Borrelia burgdorferi* u pracowników Roztoczańskiego Parku Narodowego. Przeciwciała przeciw czynnikiem HGE stwierdzono w surowicy 23,6% (13/55) pracowników, u 16,4% (9/55) wykryto wyłącznie przeciwciała anty-czynnikowi HGE, a w 7,3% (4/55) stwierdzono współwystępowanie przeciwciał przeciw obu drobnoustrojom.

Badania dotyczące szczegółowej oceny stopnia występowania *E. phagocytophila* u kleszczy *I. ricinus* na Pomorzu Zachodnim przedstawiły S k o t a r c z a k i R y m a s z e w s k a [69]. W analizowanej populacji kleszczy wykryła czynnik HGE w 1,75% (17/971), w tym 2,12% (13/613) zebranych wiosną i 1,21% (4/358) zebranych jesienią. W analizowanej populacji wykryto też zakażenia mieszane dwoma drobnoustrojami *B. burgdorferi* i *Babesia microti* oraz trzema *B. burgdorferi*, *Babesia microti* i czynnika HGE [70]. Wyniki badań potwierdzają występowanie *E. phagocytophila* u kleszczy Pomorza Zachodniego. Zauważono też duże dysproporcje w stopniu zakażenia kleszczy, które mogą wynikać z różnic zagęszczenia zwierzyny będącej naturalnym rezerwuarem *E. phagocytophila*.

S k o t a r c z a k i wsp. [70] ustaliła współwystępowanie *B. burgdorferi* z *A. phagocytophilum* i *B. microti* na poziomie 3,75% dla 2 lub 3 drobnoustrojów.

Badania S t a n c z a k i wsp. [71] z 2002 roku przeprowadzone u 424 kleszczy z Pomorza pokazują występowanie czynnika HGE w 19,2%, *B. burgdorferi* w 11,6%. Współwystępowanie obu patogenów stwierdzono w 5%.

Analizę 11 przypadków przedstawił K o n d r u s i k i wsp. [49]. U 11 chorych stwierdzono przeciwciała przeciwko *Ehrlichia chaffensis* klasy IgM. U 5 pacjentów (45,4%) rozpoznano boreliozę, która została potwierdzona występowaniem w surowicy przeciwciał w klasie IgM lub IgG. Równocześnie u 3 (27,2%) chorych wykazano przeciwciała przeciwko wirusowi kleszczowego zapalenia mózgu. W przypadku jednego chorego stwierdzono w surowicy równocześnie przeciwciała przeciwko trzem badanym czynnikiem. U żadnego z pacjentów nie stwierdzono charakterystycznych dla anaplazmozy leukopenii, trombocytopenii ani zwiększonej aktywności aminotransferaz.

Ostatnie badania oceny przeciwciał swoistych dla *A. phagocytophilum* w Polsce przeprowadzone przez G r z e s z c z u k i wsp. w 2004 roku potwierdziły występowanie zakażeń u 7,2% (n = 125) w grupie ryzyka (pracownicy Białowieckiego Parku Narodowego) [37] i 9,1% (n = 450) u mieszkańców regionu północno-wschodniej Polski [38]. Charakterystyczne było występowanie zakażeń klinicznie bezobjawowych. Jednocześnie dokonano oceny stopnia występowania zakażenia *A. phagocytophilum* kleszczy, które stwierdzono w 8,7% (2,3–13,7%, n = 559) [38].

Badanie przeprowadzone w 2003 roku na podstawie ankiety grupy 300 osób (mieszkańców lubelszczyzny) przez B u c z e k i wsp. [17] wykazało, że 79% mieszkańców stosuje jedną z metod profilaktyki. Środki odstraszające stosuje 38% osób, 35% ankietowanych nosi ubranie chroniące przed atakiem kleszczy a 3% nie siada na trawie. Niewielki procent (3%) stosuje inne metody takie jak np. palenie papierosów,

smarowanie ciała olejkami i benzyną. Z badań wynika, że dużo osób nie dostrzega zagrożenia wynikającego z pasożytowania kleszczy. Wskazuje to na niski poziom edukacji dotyczącej chorób odkleszczowych. Na uwagę zasługuje duża popularność środków odstraszających, a niewielki stopień korzystania z prostych sposobów takich jak odpowiedni ubiór oraz odpowiednie zachowanie w miejscu potencjalnego ryzyka.

11. Podsumowanie

Wzrost zainteresowania w ostatnim czasie *Anaplasma phagocytophilum* spowodował ujawnienie większej liczby przypadków zachorowań. Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wnioski, że obszar występowania anaplazmozy pokrywa się z terenem występowania innych chorób odkleszczowych. Badania przeprowadzone w Polsce na obszarach endemicznych dla boreliozy potwierdziły występowanie *A. phagocytophilum*. Badania wykonane przez polskich badaczy potwierdzają występowanie *A. phagocytophilum* [18, 36, 38, 74] jak i *E. chaffeensis* [49] u kleszczy. Ogólne zakażenie kleszczy w Polsce wynosi około 2% (średnia z ostatnich 3 lat) [69]. Badania wykonane przez Skotarczak, Wodecką i Rymaszewską potwierdzają zakażenia kleszczy *A. phagocytophilum* w województwie zachodniopomorskim. Uzyskane wyniki przez Chmielewską-Badora i Fota-Markowską [21, 33] wskazują na obecność *A. phagocytophilum* na obszarze południowo-wschodniej (Roztoczańskiego Parku Narodowego i powiecie zamojskim), a Grzeszczuk na obszarze północno-wschodniej Polski [36, 37, 38].

Dla lekarzy praktyków dostępność wyników badań nad stopniem zakażenia kleszczy na danym terenie, wykonywanych przez ośrodki naukowe jest cenną wskazówką przy rozpoznaniu. Znajomość odpowiednich metod diagnostycznych wykrywających *Anaplasma phagocytophilum*, interpretacji wyników i powiązania ich z objawami pacjenta jest bardzo ważne dla zastosowania odpowiedniej terapii. Większość zakażeń może pozostawać niezdiagnozowana z powodu niespecyficznych objawów, braku doniesienia o pogryzieniu przez kleszcze jak również małej dostępności do odpowiednich testów i nowoczesnych metod diagnostycznych.

Wzrost zainteresowania ośrodków badawczych tematyką anaplazmy, stopniem zakażenia kleszczy, rezerwuaru i ludzi, poprawa świadomości lekarzy na temat epidemiologii, kliniki i metod diagnostycznych w rozpoznawaniu infekcji *Anaplasma phagocytophilum* jest skutkiem wzrostu liczby zachorowań. Uważa się również, że do wzrostu zachorowań przyczyniły się zmiany ekologiczne w Europie, także w Polsce,

cieplejsze zimy i dłuższe lata. Zwiększona liczba podróży między kontynentami zwiększa ryzyko wystąpienia zarówno anaplazmozy jak i ehrlichiozy.

Piśmiennictwo

1. Aguero-Rosenfeld M.E., Donnarumma L., Zentmaier L., Jacob J., Frey M., Noto R., Carbonaro C.A., Wormser G.P.: Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2612–2615 (2002)
2. Aguero-Rosenfeld M.E., Dumler J.S.: Ehrlichia, Anaplasma, Neorickettsia, and Aegyptianella (w) Manual of Clinical Microbiology, red. Murray P.R., ASM, Washington, 2003, s. 1015–1029.
3. Aguero-Rosenfeld M.E., Horowitz H.W., Wormser G.P., McKenna D.F., Nowakowski J., Munoz J., Dumler J.S.: Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann. Intern. Med.* **1**, 904–908 (1996)
4. Aguero-Rosenfeld M.E., Kalantarpour F., Baluch M., Horowitz H.W., McKenna D.F., Raffalli J.T., Hsieh T., Wu J., Dumler J.S., Wormser G.P.: Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 635–638 (2000)
5. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Semenov A.V., Bolshakov C.V.: Evidence of ehrlichiosis agent found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol.* **38**, 471–474 (2001)
6. Bakken J.S., Aguero-Rosenfeld M.E., Tilden R.L., Wormser G.P., Horowitz H.W., Raffalli J.T., Baluch M., Riddell D., Walls J.J., Dumler J.S.: Serial measurements of hematologic counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 862–870 (2001)
7. Bakken J.S., Dumler J.S.: Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 554–560 (2000)
8. Bakken J.S., Dumler J.S., Chen S.M., Eckman M.R., Van Etta L.L., Walker D.H., i wsp.: Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*, **272**, 212–218 (1994)
9. Bakken J.S., Erlemeyer S.A., Kanoff R.J., Silvestrini T.C., Goodwin D.D., Dumler J.S.: Demyelinating polyneuropathy associated with human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1323–1324 (1998)
10. Bakken J.S., Dumler J.S.: Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis among permanent residents of northwestern Wisconsin. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1491–1496 (1998).
11. Bakken J.S., Krueth J., Wilson-Nordskog C., Tilden R.L., Asanovich K., Dumler J.S., i wsp.: Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA*, **275**, 199–205 (1996)
12. Bjoersdorff A., Bagert B., Massung R.F., Gusa A., Eliasson I.: Isolation and Characterization of Two European Strains of *Ehrlichia phagocytophila* of Equine Origin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 341–343 (2002)
13. Blanco J.R., Oteo J.A.: Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**, 763–772 (2002)
14. Blouin E.F., Kocan K.M.: Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) cells. *J. Med. Entomol.* **35**, 788–797 (1998)

15. Brouqui P., Birg M.L., Raoult D.: Cytopathic effect, plaque formation, and lysis of *Ehrlichia chaffeensis* grown on continuous cell lines. *Infect. Immun.* **62**, 405–411 (1994)
16. Brouqui P., Dumler J.S., Lienhard R., Brossard M., Raoult D.: Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet*, **346**, 782–783 (1995)
17. Buczek A., Bartosik K., Olszewski T., Sałata M., Stepuch M.: Metody profilaktyki przeciwkleszczowej stosowane przez mieszkańców makroregionu lubelskiego. V Międzynarodowe Sympozjum; Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite – znaczenie medyczne i sanitarne, Kazimierz Dolny, 2003, P2, s. 17.
18. Bukowska B., Czarnecka I., Walory J., Paluchowska E., Grzesiowski P., Zabielski S.: Występowanie przeciwciał swoistych dla czynnika HGE i *Babesia microti* wśród żołnierzy odbywających służbę w północno-wschodniej Polsce. V Międzynarodowe Sympozjum; Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite – znaczenie medyczne i sanitarne. Kazimierz Dolny, 2003, P3, s. 19.
19. Carlyon J.A., Fikrig E.: Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Review. Cell Microbiol.* **5**, 743–754 (2003)
20. Centers for Disease Control and Prevention: Case definition conditions under public health surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **46** (RR-10), 46–47 (1997)
21. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Zwoliński J.: Występné badania seroepidemiologiczne w kierunku czynnika ludzkiej granulocytozy granulocytarnej (HGE) u pracowników eksploatacji lasów. V Międzynarodowe Sympozjum; Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite – znaczenie medyczne i sanitarne. Kazimierz Dolny, 2003, P4, s. 21.
22. Consensus Workshop on Diagnosis of Human Ehrlichiosis: American Society for Rickettsiology. *Newsletter*, **271**, 1–8 (1999)
23. Comer J.A., Nicholson W.L., Olson J.G., Childs J.E.: Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 558–564 (1999)
24. Dobbenburgh A. van, Dam A.P. van, Fikrig E.: Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1214–1216 (1999)
25. Dumler J.S., Asanovich K.M., Bakken J.S.: Analysis of Genetic Identity of North American *Anaplasma phagocytophilum* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3392–3394 (2003)
26. Dumler J.S., Asanovich K.M., Bakken J.S., Richter P., Kimsey R., Madigan J.E.: Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1098–1103 (1995)
27. Dumler J.S.: Is human granulocytic ehrlichiosis a new Lyme disease? Review and comparison of clinical, laboratory, epidemiological, and some biological features. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 43–47 (1997)
28. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R.: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and «HGE agent» as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51b**, (Pt 6), 2145–2165 (2001)
29. Dumler J.S., Dawson J.E., Walker D.H.: Human ehrlichiosis: hematopathology and immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. *Hum. Pathol.* **24**, 391 (1993).
30. Fingerle V., Goodman J.L., Johnson R.C., Kurti T.J., Munderloh U.G., Wilske B.: Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3244–3247 (1997)
31. Fingerle V., Munderloh U.G., Liegl G., Wilske B.: Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* **188**, 145–149 (1999)
32. Fishbein D.B., Dawson J.E., Robinson L.E.: Human ehrlichiosis in United States, 1985 to 1990. *Ann. Intern. Med.* **120**, 736–743 (1994)
33. Fota-Markowska H., Bielec D., Cisak E., Chmielewska-Badora J., Patarska-Mach E.: Erlichiosa granulocytarna – Dodatkowo odczyn immunofluorescencji pośredniej (IFA) u pracowników Roztoczańskiego Parku Narodowego kierowanych na badania serologiczne w kierunku Borreliozy z Lyme. V Międzynarodowe Sympozjum; Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite – znaczenie medyczne i sanitarne. Kazimierz Dolny, 2003, P9, s. 35.
34. Gern L., Lumair P.F.: Ecology of Lyme Borreliosis. *Inf. Dis. Rev.* **1**, 55–56 (1999)
35. Greig B., Asanovich K.M., Armstrong P.J., Dumler J.S.: Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 44–48 (1996)
36. Grzeszczuk A., Stanczak J., Kubica-Biernat B.: Serological and molecular evidence of human granulocytic ehrlichiosis focus in the Białowieża Primeval Forest (Puszcza Białowieża), northeastern Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 6–11 (2002)
37. Grzeszczuk A., Puzanowska B., Mięgoć H., Prokopowicz D.: Incidence and Prevalence of Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Prospective study in healthy individuals exposed to ticks. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 155–157 (2004)
38. Grzeszczuk A., Stańczak J., Kubica-Biernat B., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Prokopowicz D.: Human anaplasmosis in North-Eastern Poland: Seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 99–103 (2004)
39. Horowitz H.W., Aguero-Rosenfeld M., Dumler J.S., McKenna D.F., Hsieh T.C., Wu J., Schwartz I., Wormser G.P.: Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Ann. Intern. Med.* **129**, 461–463 (1998)
40. Horowitz H.W., Aguero-Rosenfeld M.E., McKenna D.F., Holmgren D., Hsieh T.C., Varde S.A., Dumler S.J., Wu J.M., Schwartz I., Rikihisa Y., Wormser G.P.: Clinical and laboratory spectrum of culture-proven human granulocytic ehrlichiosis: comparison with culture-negative cases. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1314–1317 (1998)
41. Horowitz H.W., Hsieh T.C., Aguero-Rosenfeld M.E., Kalantarpour F., Chowdhury I., Wormser G.P., Wu J.M.: Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**, 786–788 (2001)
42. Horowitz H.W., Kilchevsky E., Haber S., Aguero-Rosenfeld M., Kranwinkel R., James E.K., Wong S.J., Chu F., Liveris D., Schwartz I.: Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* **339**, 375–378 (1998)
43. Hsieh T.C., Wormser G.P. i wsp.: Cellular changes and induction of apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 298–303 (1997)
44. Ijdo J.W., Wu C., Magnarelli L.A., Fikrig E.: Serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by a recombinant

- HGE-44-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3540–3544 (1999)
45. Inokuma H., Brouqui P., Drancourt M., Raoult D.: Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3031–3039 (2001)
 46. Jahangir A., Kolbert C., Edwards W., Mitchell P., Dumler J.S., Persing D.H.: Fatal pancarditis associated with human granulocytic Ehrlichiosis in a 44-year-old man. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1424–1427 (1998)
 47. Jenkins A., Kristiansen B.E., Allum A.G., Aakre R.K., Strand L., Kleveland E.J., van de Pol I., Schouls L.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in Ixodes ticks from southern Norway. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3666–3671 (2001)
 48. Karlsson U., Bjoersdorff A., Massung R.F., Christensson B.: Human granulocytic ehrlichiosis – a clinical case in Scandinavia. Human granulocytic ehrlichiosis – a clinical case in Scandinavia. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**, 73–74 (2001)
 49. Kondrusik M., Pucilo K., Świerzbńska R., Pancewicz S., Zajkowska J., Grygorczuk S., Hermanowska-Szpakowicz T.: Występowanie przeciwciał przeciwko *Ehrlichia chaffeensis* wśród chorych pokłutych przez kleszcze. *Pol. Merk. Lek.* **13b**, 462–464 (2002)
 50. Lee F.S., Chu F.K., Tackley M., Wu A.D., Atri A., Wessels M.R.: Human granulocytic ehrlichiosis presenting as facial diplegia in a 42-year-old woman. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 1288–1291 (2000)
 51. Lee J.H., Lee S.H. i wsp.: Differentiation of Rickettsiae by groEL Gene Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2952–2960 (2003)
 52. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M.: PCR detection of granulocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1002–1007 (2000)
 53. Maeda K., Markowitz N., Hawley R.C., Ristic M., Cox D., McDade J.E.: Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* **316**, 853–856 (1987)
 54. Massung R.F., Owens J.H., Ross D., Reed K.D., Petrovec M., Bjoersdorff A., Coughlin R.T., Beltz G.A., Murphy C.I.: Sequence Analysis of the ank Gene of Granulocytic Ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2917–2922 (2000)
 55. Massung R.F., Slater K., Owens J.H., Nicholson W.L., Mather T.N., Solberg V.B., Olson J.G.: Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1090–1095 (1998)
 56. Maurin M., Bakken J.S., Dumler J.S.: Antibiotic Susceptibilities of Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum Strains from Various Geographic Areas in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 413–415 (2003)
 57. Morais J.D., Dawson J.E., Greene C., Filipe A.R., Galhardas L.C., Bacellar F.: First European case of ehrlichiosis. *Lancet*, **338**, 633–634 (1991)
 58. Nuti M., Serafini D.A., Bassetti D., Ghionni A., Russino F., Rombola P., Macri G., Lillini E.: Ehrlichia infection in Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 663–5 (1998)
 59. Oteo J.A., Blanco J.R., Martinez de Artola V., Ibarra V.: First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 430–432 (2000)
 60. Parola P., Beati L., Cambon M., Brouqui P., Raoult D.: Ehrlichial DNA amplified from Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in France. *J. Med. Entomol.* **35**, 180–183 (1998)
 61. Parola P., Raoult D.: Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 80–83 (2001)
 62. Petrovec M., Lotric Furlan S., Zupanc T.A., Strle F., Brouqui P., Roux V., Dumler J.S.: Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1556–1559 (1997)
 63. Petrovec M., Sumner J.W., Nicholson W.L., Childs J.E., Strle F., Barlic J., Lotric-Furlan S., Avsic Zupanc T.: Identity of ehrlichial DNA sequences derived from Ixodes ricinus ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 209–210 (1999)
 64. Pusterla N., Leutenegger C.M., Huder J.B., Weber R., Braun U., Lutz H.: Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in Ixodes ricinus ticks in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1332–1334 (1999)
 65. Rymaszewska A.: Ehrlichioza – nowe zagrożenie ze strony kleszczy. *Post. Mikrobiol.* **39**, 189–198 (2000)
 66. Rikihisa Y.: The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 286–308 (1991)
 67. Skarphedinsson S., Sogaard P., Pedersen C.: Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis in high-risk groups in Denmark. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**, 206–210 (2001)
 68. Skotarczak B., Wodecka B., Cichocka A.: Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in Ixodes ricinus ticks from north-western Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **9**, 25–28 (2002)
 69. Skotarczak B., Rymaszewska A.: Wstępne badania czynnika etiologicznego ludzkiej ehrlichiozy (HGE) w kleszczach z zachodnio-północnej Polski. *Wiad. Parazytol.* **47**, 95–101. (2001)
 70. Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M.: Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J. Parasitol.* **89**, 194–196 (2003)
 71. Stanczak J., Racewicz M., Kruminis-Lozowska W., Kubica-Biernat B.: Coinfection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 198–201 (2002)
 72. Standaert S.M., Yu T., Scott M.A., Childs J.E., Paddock C.D., Nicholson W.L., Singleton J. Jr., Blaser M.J.: Primary isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from patients with febrile illnesses: clinical and molecular characteristics. *J. Infect. Dis.* **181**, 1082–1088 (2000)
 73. Stedingk L.V. von, Gurtelschmid M., Hanson H.S., Gustafson R., Dotevall L., Engvall E.O., Granstrom M.: The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. *Clin. Microbiol. Infect.* **3**, 573–574 (1997)
 74. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska-Szpakowicz T., Sawicki W., Sulek K.: First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 196–198 (2001)
 75. Taylor M.J., Hoerauf A.: Wolbachia bacteria of filarial nematodes. *Parasitol. Today.* **15**, 437–442 (1999)
 76. Walls J.J., Aguero-Rosenfeld M., Bakken J.S., Goodman J.L., Hossain D., Johnson R.C., Dumler J.S.: Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2968–2973 (1999)
 77. Walker D.H., Dumler J.S.: *Ehrlichia chaffeensis* (human ehrlichiosis) and other ehrlichiae, w: Principles and practice of infectious diseases (red. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.) Wyd. 4. Churchill Livingstone, New York, 1995, s. 1747.

78. Walker D.H., Dumler J.S.: Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**, 785–791 (1997)
79. Wicki R., Leutenegger C.M. i wsp.: Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 427–432 (2000)
80. Wong S.J., Brady G.S., Dumler J.S.: Serological responses to *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Borrelia burgdorferi* in patients from New York State. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2198–2205 (1997)
81. Wormser G.P., Horowitz H.W., Dumler J.S., Schwartz I., Aguero-Rosenfeld M.: False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis. *Lancet*, **347**, 981–982 (1996)
82. Vignes F. des, Piesman J., Heffernan R., Schulze T.L., Stafford K.C. 3rd, Fish D.: Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J. Infect. Dis.* **183**, 773–778 (2001)

Agnieszka Mrozik¹, Zofia Piotrowska-Seget², Sylwia Łabużek¹

¹Katedra Biochemii Uniwersytetu Śląskiego, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, e-mail:amrozik@us.edu.pl

²Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Śląskiego, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, e-mail:amrozik@us.edu.pl

Wpłynęło w lutym 2005 r.

Abstract: The application of microorganisms to destroy, or reduce the concentration of, hazardous wastes on contaminated sites is called bioremediation. Such a biological treatment system has various applications, including clean-up of contaminated sites such as water, soils and sludges. A number of bacteria strains existing in natural environment are capable of metabolizing environmental pollutants. Many of them have been utilized in a variety of bioremediation processes. Apart from wild-type strains of bacteria, genetically modified microorganisms (GMMs) have shown potential for bioremediation application. There are many factors that affect the biodegrading processes. Each process depends on species of bacteria, their survival in environment, physico-chemical characteristics of substrate and its availability, and a range of environmental factors, including pH, oxygen concentration, temperature, moisture content, carbon and energy sources. To estimate the effectiveness of bioremediation it is necessary to analyse the diversity of pollutant degrading bacterial populations and detection of catabolic genes in environmental samples. There are many molecular tools (FISH, *in situ* PCR, DGGE, TGGE, T-RFLP) that are suitable for monitoring changes in bacteria community structure and diversity during hydrocarbon degradation.

1. Introduction. 2. Bioremediation systems. 3. Bacterial activity and diversity. 4. Physico-chemical factors affecting bioremediation. 5. Bioaugmentation. 6. Bacteria in petroleum biodegradation. 7. Bacteria in phytoremediation. 8. Monitoring of bioremediation. 9. Conclusions

Bakterie w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych wybranymi węglowodorami

Streszczenie: Bioremediacja to metoda wykorzystująca żywe organizmy i wytwarzane przez nie enzymy w procesach oczyszczania środowiska. Znalazła ona zastosowanie w usuwaniu wielu toksycznych związków z zanieczyszczonych gleb, wody i ścieków. W bioremediacji wykorzystywane są szczepy bakterii zdolne do transformacji i mineralizacji tych związków. Oprócz bakterii, naturalnie występujących w środowisku, obiecującym wydaje się wykorzystanie bakterii modyfikowanych genetycznie (GMMs) o wysokim potencjale degradacyjnym. O wydajności procesu bioremediacji decyduje wiele czynników, w tym fizyko-chemiczne własności zanieczyszczeń, warunki środowiskowe (pH, temperatura, wilgotność, stężenie tlenu, dostępność składników pokarmowych) oraz zdolności indywidualnych szczepów do rozkładu zanieczyszczeń. Do oceny efektywności bioremediacji niezbędna jest analiza różnorodności populacji bakterii oraz detekcja genów katabolicznych w środowisku. Do monitorowania zmian w populacjach tych mikroorganizmów użyteczne są nie tylko metody klasyczne, ale również metody biologii molekularnej (FISH, *in situ* PCR, DGGE, TGGE, T-RFLP).

Wstęp. 2. Rodzaje bioremediacji. 3. Różnorodność i aktywność bakterii. 4. Fizyko-chemiczne czynniki wpływające na bioremediację. 5. Bioaugmentacja. 6. Bakterie w biodegradacji ropy naftowej. 7. Bakterie w fitoremediacji. 8. Monitorowanie bioremediacji. 9. Podsumowanie

Key words: bacteria, bioremediation, monitoring

Słowa kluczowe: bakterie, systemy bioremediacji, monitorowanie

1. Introduction

The major problems facing the industrialized world today is increasing contamination of soils, groundwaters, sediments, industrial and municipal wastewater, agricultural wastes with hazardous and toxic hydrocarbons. The need to clean-up these sites requires the application of new technologies that are more efficient than the conventional approach of disposal. The most promising technology seems to be bioremediation, the use of microorganisms or microbial processes to detoxify and degrade environmental contaminants. Bioremediation offers several advantages over the conventional, physico-chemical approaches, especially

for diluted and widely spread contaminants. However, some investigators state that bioremediation is still an immature technology. The reason for this is that current knowledge of changes in microbial communities during bioremediation is limited, and microbial consortia is still treated as a “black box” because many environmental bacteria cannot yet be cultivated by conventional methods [32, 38, 58].

Bioremediation utilizes the natural role of microorganisms in transformation, mineralization, or complexation by directing those capabilities towards organic and inorganic pollutants. Although many bacterial species have a potential role in bioremediation, the most attention is focused on hydrocarbon-utilizing

microorganisms. These bacteria are ubiquitous in nature, frequently they harbour of marine water and soils. However, efficiency of naturally occurring microorganisms for bioremediation could be significantly improved by optimizing certain environmental factors. The different way to improve the degradative performance is the use of genetic engineering strategies for microorganisms destined for release into the environment [74].

The other techniques that have been used in bioremediation to enhance degradation and detoxification of the clean-up of man-made pollutants are stimulation of the activity of indigenous microorganisms, inoculation of the sites with microorganisms of specific biotransforming abilities and application of genetically modified microorganisms [12, 32, 74, 93].

2. Bioremediation systems

Bioremediation is a interdisciplinary technology involving microbiology, biochemistry, genetics, microbial ecology and chemistry. Microorganisms are the primary stimulant in the cleaning up of polluted sites. Bioremediation is classified as *ex situ* or *in situ*. *Ex situ* methods are the treatments that remove contaminants at the separate treatment facilities. In turn, *in situ* technologies involve the treatment of the contaminants in the place itself. Depending on how aggressively bioremediation is persuaded it is divided on intrinsic and engineered strategy (Fig. 1.). Intrinsic bioremediation is passive – it relies on the innate capacity of microorganisms present in field sites which metabolize the contaminants. Because intrinsic bioremediation occurs in the landscape where both indigenous microorganisms and pollutants are present, this type of bioremediation necessarily occurs *in situ*. This bioremedia-

tion strategy has been well documented for a variety of contaminants and habitats, including low-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum-related compounds, chlorinated solvents in groundwater and soil, and crude oil in marine waters [31, 44, 65, 76]. Alternatively, engineered bioremediation takes an active role in modifying a site to encourage and enhance the degradative abilities of microorganisms. This approach accelerates intrinsic bioremediation or completely replace it through the use of site modification procedure such as excavation, hydrologic manipulations and installation of bioreactors. Engineered bioremediation is especially well suited for treating nonvolatile, sparingly soluble contaminants which properties impede successfully treatment by using other technologies. Engineered *ex situ* bioremediation has been used commonly in municipal sewage treatment systems for many years. In sewage treatment systems wastewaters are directed through an array of controlled environments, which encourage microbial growth in filters, tanks and digesters. Physical, chemical and microbiological manipulations remove carbonaceous, nitrogenous and other material from water before it is discharged into rivers, lakes and oceans. Each of the two major engineered bioremediation approaches may involve solid-, slurry-, or vapour- phase system for encouraging microorganisms to proliferate and utilize contaminants [45].

Decision for selecting the most effective strategy is based on characteristics of the contaminants (molecular structure, solubility, volatility, and susceptibility to microbial attack and toxicity), the contaminated sites (soil type, hydrology, climate) and the microbial activity (pure or mixed culture, growth conditions and supplements).

In situ bioremediation technologies currently utilized in the field are classified into the following three categories: bioattenuation, biostimulation and bioaugmen-

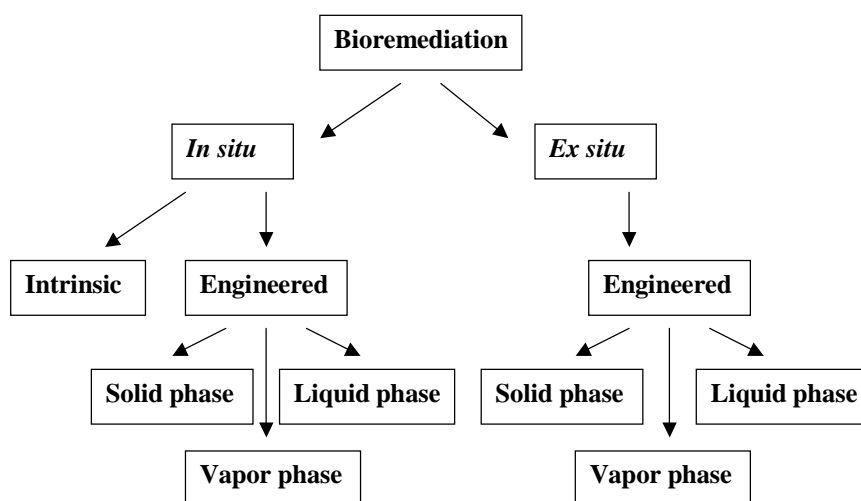


Fig. 1. The categories of bioremediation approaches

Table I

The classification of bioremediation technologies

Bioremediation technology	Contaminants treated
<i>In situ</i> techniques	
Intrinsic bioremediation	PAHs, PCBs, phenolic compounds, pesticides, petroleum compounds, chlorinated hydrocarbons, dioxines, organic solvents
Bioventing	BTEX, petroleum hydrocarbons
Land farming	Phenolic compounds, pesticides, petroleum compounds, organic wood preservatives, explosives
Biostimulation	Trichlorethylene, phenolic compounds
Bioaugmentation	Chlorinated and methylated phenols, carbon tetrachloride, 2,4,6-trinitrotoluene, petroleum hydrocarbons, crude oil
<i>Ex situ</i> techniques	
Land treatment	Pesticides, PAHs, phenolic compounds
Composting	Halogenated aromatic hydrocarbons, organic wood preservatives, pesticides, explosives
Biofilters	Volatile compounds
Bioreactors	Alcohols, BTEX, chlorinated aliphatics, ketones, phenolic compounds, pesticides
Bioaugmentation	Chlorinated and methylated phenols, carbon tetrachloride, 2,4,6-trinitrotoluene, PAHs

BTEX-mixture of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes. PAHs-polycyclic aromatic hydrocarbons, PCBs-polychlorinated biphenyls.

tation. Bioattenuation is a method of monitoring the natural progress of degradation to ensure that contaminants concentration decreases with time. It is widely applied as a method for cleaning underground storage tanks, soil and groundwater contaminated with petroleum in the United States [18, 32, 41].

Biostimulation is a method applied if the rate of pollutant biodegradation in the environment is very slow or does not occur. In this case, the environment has to be manipulated in such a way that degradation processes are stimulated and the reaction rates increase. Biostimulation includes supplying the environment with nutrients mainly nitrogen and phosphorous, with electron acceptors such as oxygen and with relatively easy degraded substrates such as phenol, methanol and toluene. During biostimulation the concentration of these chemicals should be carefully monitored. This strategy is expected to become a reliable and save clean-up technology [9, 47].

The third category of *in situ* bioremediation is bioaugmentation. It is a way to enhance the biodegradative capacities of contaminated sites by inoculation of bacteria with desired metabolic abilities. This method is the most applicable for the treatment of compounds, which are degraded very slowly, if at all, even under optimal conditions. Bioaugmentation has been successfully used to degrade pentachlorophenol and a mixture of aromatic hydrocarbons in soil. Two approaches are applied to bioaugment soil or water: the introduction of selectively enriched isolates capable of performing a desired function, or the introduction of genetically modified microorganisms [32, 90, 92]. The successful

bioaugmentation in the environment is biased by several limitations affecting the survival of inoculants. The classification of major bioremediation technologies is illustrated in Table I.

3. Bacterial activity and diversity

A number of bacterial strains capable of metabolizing environmental contaminants have been isolated from natural environment, mainly from soil. Before field applications, these bacteria must be precisely identified and their biochemical and physiological properties should be well determined. Many studies have been conducted to understand the fundamental mechanisms of biodegradation, include examination of pathways, formation of intermediate and terminal metabolites, use of the substrates as sources of C, N, P and S, induction of catabolic enzymes, the genes encoding enzymes related to toxic chemical degradation and their resistance to extended concentrations of chemical compounds. Apart from laboratory experiments concern physiological optima of temperature, pH, and oxygen concentration, toxicity of substrates for both indigenous and exogenous microorganisms and existence of cometabolisms or concurrent metabolism the studies under field conditions have to be conducted [1].

Many microorganisms are able to utilize various types of hydrocarbons – short chain, long-chain and aromatic compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons as a source of carbon and energy. These substrates serve as an electron donor resulting in

microbial growth. When the compounds can not serve as a source of carbon and energy by nature of the molecular structure that does not induce the required catabolic enzymes, application of cometabolism is required. Most of bacteria known as good hydrocarbon degraders are usually gram-negative and belong to the genus *Pseudomonas*. It has been reported that bacteria from this genus degrade numerous organic compounds such as toluene, phenol, naphthalene, fluoranthene, polychlorinated biphenyls, trichloroethylene and dioxin-like compounds [13, 21, 23, 53, 56]. The biodegradative abilities to degrade different hydrocarbons have also been studied in bacteria from the genera *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium* and *Xanthomonas* [26, 41, 62, 72]. The increasing attention also needs to be directed to gram-positive bacteria belonging to the genera *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Bacillus* [4, 17, 52]. The presented data have been obtained under controlled laboratory conditions, but the environment is not a laboratory. The natural environment is highly heterogeneous so that the impact of many environmental factors should be taken into consideration.

The successful bioremediation technology depends on many microbial and a range of environmental factors. It is necessary to use the right microorganisms on the right place with proper environmental condition. The right microbes are bacteria and fungi, which have the physiological and metabolic capabilities to transform or degrade the pollutants. Bioremediation processes may go under aerobe or anaerobe conditions. Aerobic reactions are characterized by metabolic activities involving oxygen as a reactant. Dioxygenases and monooxygenases are two main enzymes employed by aerobic organisms during transformation and mineralization of aromatic contaminants. Anaerobic microorganisms have a range of electron acceptors such as nitrate, iron, carbon dioxide, sulphur and sulphate. Until quite lately it has been thought that in the absence of oxygen biodegradation processes proceed slowly, less effectively and the biochemical mechanisms of many hydrocarbons degradation have not yet been determined in detail [10, 11, 14]. Recent reports indicate that the diversity of anaerobic microbial metabolism is far greater than was previously assumed, and that many contaminants previously considered to be recalcitrant under anoxic conditions can in fact be transformed in the absence of molecular oxygen [15, 33].

The outcome of each degradation process depends on indigenous microbial biomass and population diversity. The high number of microorganisms and a great diversity of microbial populations are typical for surface soils, which receive regular inputs of organic matter. It results in high rate of bioremediation in this soil zone. With increasing depth in the soil pro-

file, and in groundwater sediments bioremediation becomes lower due to lower levels of organic matter, lack in macronutrients such as nitrogen, sulphur and phosphorous, lower microbial biomass and lower microorganisms diversity [95].

There are no microorganisms or groups of microorganisms universally applicable to bioremediation. It should be noted that some groups of microorganisms are metabolically versatile and are capable of degrading a wide spectrum of substrates. Such catabolic versatility has been observed in phenol-degrading bacteria. Aerobic degradation of phenolic compounds is initiated by its hydroxylation to form corresponding catechol [16, 27, 99]. They are two types of bacterial phenol hydroxylases, the single-component and multi-component types. Among them the second one is considered to be the major enzyme in the natural environment [22, 60]. Some of multi-component hydroxylases have similar structure, catabolic sites and exhibit different substrate specificity for substituted phenols [86, 95].

4. Physico-chemical factors affecting bioremediation

The bioremediation techniques demand characteristics of the physico-chemical state of the contaminants and description of environmental parameters limiting bioremediation rate. The majority of toxic organic environmental contaminants, such as polycyclic aromatic compounds (PAHs), chlorinated aromatic hydrocarbons, dioxins and nitroaromatic compounds have low solubility in water which increases their sorption to surface of organic matter of soil. Therefore one of the most important factors responsible for successful bioremediation is bioavailability of hydrocarbon for microbial degradation. When organic molecules are bound irreversibly to soil, biodegradation is inhibited [1, 9, 36, 73]. For increasing the bioavailability of hydrophobic compounds, which serve as a source of energy, bacteria produce the different surface active materials called biosurfactants. There are two types of bacterial surfactants: the low- and the high-molecular weight biosurfactants. The low molecular weight surfactants are generally glycolipids such as rhamnolipids, trehalose lipids and sophorolipids. They are disaccharide acylated with long-chain fatty acids or hydroxy fatty acids. One of the best-studied glycolipids is rhamnolipid, which consists of two moles of rhamnose and two moles of β -hydroxydecanoic acid, synthesized by many species of *Pseudomonas* [40]. Newly, a new type of glycolipids, glucose lipids produced by *Alcanivorax borkumensis* has been described [101]. The high molecular weight surfactants are produced by a large number of bacterial species from dif-

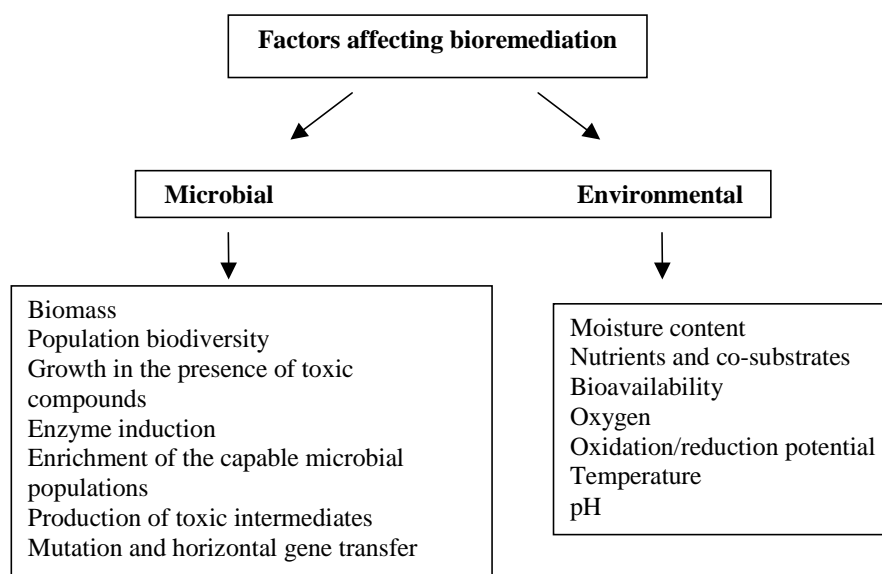


Fig. 2. The major microbial and environmental factors affecting bioremediation

ferent genera and are composed of polysaccharides, proteins, lipopolysaccharides, lipoproteins or complex mixtures of these biopolymers. The well known high molecular weight biosurfactants is emulsan from *Acinetobacter* RAG-1, which is a complex of an anionic heteropolysaccharide and protein which surface activity results from the presence of fatty acids that are attached to the polysaccharide back bone via O-ester and N-acyl linkages [69]. The other from this group - alasan, produced by a strain of *Acinetobacter radioresistens*, is a complex of an anionic polysaccharides and protein with a molecular weight of approximately 10^6 Da [55]. These biosurfactants are less effective in reducing interfacial tension and exhibit considerable substrate specificity. For example, some emulsify efficiently mixtures of aliphatic and aromatic hydrocarbons but does not emulsify pure aliphatic and aromatic hydrocarbons. Others can emulsify pure hydrocarbons but only with a high molecular weight [69]. These findings show that microorganisms can use their biosurfactants to regulate their cell-surface hydrophobicity properties. In general, biosurfactants from bacteria growing on hydrocarbons act as biodispersants by preventing coalescence of oil drops in water. There are two approaches in the use of biosurfactants in bioremediation technology. The first is application of purified surfactants isolated from bacteria, and the second one is the introduction to the environment of bioemulsifier-overproducing bacteria. The similar role as biosurfactants, may play synthetic surfactants such as SDS, Triton X-102, Brij 35, Marlipal 013/90 and Genapol X150 [25, 91].

The other factors that control *in situ* bioremediation and simultaneously impact the microbial populations are moisture content, nutrients, dissolved oxygen, pH, and temperature. Moisture content, is not only an im-

portant parameter in determining microbial activity, but soil water also plays role as a transport medium carrying nutrients and waste products. Optimum level of moisture, expressed as percentage of field water capacity, ranged from 25–85% for unsaturated soil. A contaminated site usually has a sub-optimal nutrient balance. Sufficient nitrogen, phosphorous and other nutrients do not limit microbial growth when a carbon:nitrogen:phosphorous ratio is approximately 300:10:1. Bioremediation also depends on the concentration of molecular oxygen, which stimulate the breakdown of contaminants. In soil, for aerobic activity > 0.2 with a minimum air-filled pore space of 10% and for anaerobic activity 0.2 with a maximum air-filled pore space of 1% are recommended. Among environmental factors limiting efficiency of bioremediation are temperature and pH. In soil, particularly in northern countries, the temperature is too low during a large part of the year for efficient microbial degradation. The same conditions are characterized for the deeper soil layers in other parts of the world. The optimum level for soil temperature is between 15 to 45°C and for pH 5.5–8.5 [9, 68, 88]. The major factors affecting bioremediation are illustrated in Fig. 2.

5. Bioaugmentation

The indigenous microorganisms has been exposed to the xenobiotic contaminants long enough for genetic evolution to create a capacity to degrade these compounds. This evolution, involving mutations and horizontal gene transfer, takes place constantly but relatively slow. Therefore, the removal of toxic chemicals may be inefficient due to low cell number or low activity level.

The biodegradation potential of microbial communities of polluted soil may be increased by bioaugmentation, the addition of competent microorganisms to natural environment. The practice of bioaugmentation is not new. It has been successfully used to degrade pentachlorophenol and a mixture of aromatic hydrocarbons in soil [51, 72]. Recently, Barathi and Vasudevan [7] observed enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbons after the introduction of *Pseudomonas fluorescens* NS1 strain to soil. Bioaugmentation may be especially useful when the concentration of the contaminants is toxic to indigenous microflora [29]. The ideal microorganisms for bioaugmentation should possess a wide range of degradative activity, should be fast acting, short lived, mobile, adhesive, resistant to fluctuations of environmental factors and inexpensive. Bacteria for this purpose may be isolated from given contaminated soil and after culturing under laboratory conditions they return to the same soil. This treatment is called reinoculation of soil with indigenous microorganisms. The second approach involves isolation and selection of appropriate microorganisms from sites, with similar contaminants that are present in soil submitted to clean-up by these selected microorganisms. Nowadays, the special attention is focus on apply genetically modified microorganisms (GMMs) for bioremediation and studying the gene transfer in soil systems [68, 74, 90, 92].

The current state of recombinant gen technology allows a high degree of specificity in the construction of microorganisms of potential industrial interest [70, 74]. GMMs have an increase of the substrate range of contaminants, that can be degraded. For example, phenol degradation pathway (dmp) encoded by a large plasmid pVI150 of *Pseudomonas* sp. CF600 is induced by 2-methyl phenol but not by 4-methyl phenol [78, 79]. Pavel and Shingler [59] using genetic engineering provided the mutant strain DmpR which has been used by both 2- and 4-methyl phenol, what arise a broader substrate specificity. Other approach used to broad the substrate range is DNA shuffling, a method for *in vitro* homologous recombination of pools of selected mutant genes by random fragmentation and polymerase chain reaction (PCR) reassemble. Kumara et al. [39] have tested mutagenic DNA shuffling for molecular evolution in genes responsible for the degradation of polychlorinated biphenyls and other aromatics.

The capacity to degrade various aromatic toxic compounds is often carried out on large plasmids which can be conjugative or mobilizable [8, 77]. It has been reported that similar bacteria, carrying plasmids with high homology have been isolated from different sites, localized far away from each other. For example, such homology was observed in *Pseudomonas putida*

(arvilla) mt-2 found in Japan, *P. putida* HS1 isolated in USA and *P. putida* MT-53 from North Wales [80]. These strains after introduction to the soil may be a donor of degradative plasmid for potential indigenous recipients. The most efficient way to transfer plasmids between one strain to another is conjugation and transformation. Ramos-Gonzales et al. [64] observed high frequencies of transfer and expression of TOL plasmid in soil between a donor *P. putida* EEZ15 and recipients *P. aeruginosa* TNSK2, *P. fluorescens* EEZ20 and *P. stutzeri* EEZ22. In these cases the gen transfer frequency was on the order of 1 to 10^{-2} transconjugant per recipient. Gene transfer between *P. putida* strains strongly depended on the survival rates of the donors and recipients in the soil and the initial inoculum size and the presence of chemicals that are toxic for either the donor or the recipient. The cell densities of bacteria participating in the conjugation had an essential impact on gene transfer rate. When the donor and recipient *P. putida* EEZ3 reached about 10^8 cfu/g of soil, an increase of the number of transconjugant was observed. Conjugational transfer in soil environments depends also on the type of soil used. Ramos-Gonzales et al. [64] found also the greater number of transconjugants in soil with high organic matter content than in soil lack in organic matter. In turn, Hollowell et al. [30] studied the genetic transfer and expression of plasmid RP4:TOL, that has gene clusters encoding the metabolic pathways for benzene, toluene and xylene degradation, between *E. coli* C600 and *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* and degradation of *m*-toluate in soil experiments. They have reported that this plasmid was stable only in *S. meliloti*. In next two strains RP4:TOL was characterized with high instability. Moreover, *S. meliloti* (RP4:TOL) exconjugant completely degraded 1 mM *m*-toluate during 8 weeks. Therefore, these investigations have important implications for the genetic engineering of many bacterial strains for bioremediation of contaminated soils with hydrocarbons.

One of the most important factors affecting the bioaugmentation is survival of introduced indigenous, exogenous and GMMs in the environment. To improve the survival of inoculants in soil many different microbial cell carriers such as a peat, mineral oil, agarose, clay and wood chips are used. Promising methods in this field appear to be immobilization and encapsulation of microorganisms [92]. Wiesel et al. [98] has shown that immobilized onto granular clay or lava slag mixed bacterial culture degrading PAHs characterized higher biodegradation rate in comparison to free cells. Encapsulation ensures the consistent presence of catabolically active biomass, provides for the slow release of nutrients and provides a protective niche for the introduced microorganisms. Stormo and Crawford

[84] encapsulated bacteria into microspheres of alginate, agarose, or polyurethane. Cell suspensions were passed through a low-pressure nozzle into an aqueous phase where matrix polymerization or gelation yielded beads 2 to 50 mm in diameter. Trials with a chlorophenol-degrading *Flavobacterium* species have shown that cells entrapped by these procedures were as catabolically active as free cells.

6. Bacteria in petroleum biodegradation

A number of reviews cover different aspects of the bioremediation of the marine environment after oil spills [5, 6, 24, 28, 49]. Hydrocarbon-utilizing bacteria are widely distributed in the aquatic system. These microorganisms naturally degrade numerous of contaminating petroleum hydrocarbons sites what resulting in cleaning-up of water and costs. It should be noted that many compounds found in petroleum are not completely degraded and always leave some complex residue appearing as a black tar containing high content of asphaltic compounds [6, 34]. The biodegradation of petroleum in the marine environment is carried out by many species of bacteria, especially belonging to the genus *Pseudomonas*. Recently, Kasai et al. [37] found out that bacteria from the genus *Cyclostaticus* play a primary role in the degradation of crude oil and PAH components. These bacteria has been isolated from several sites including Resurrection Bay (Alaska), Puget Sound (Washington) and Gulf of Mexico. It is interesting that these bacteria utilize many aromatic hydrocarbons but can not utilize sugars and amino acids. Generally, in pristine environment hydrocarbon-degrading bacteria comprises less than 1% of the total bacterial population. In uncontaminated water, these bacteria utilize hydrocarbons that are naturally produced by algae, plants and other sea organisms. After contamination with petroleum the number of hydrocarbon-degrading bacteria significantly increase and reach about 10% of total bacterial population [5]. The biodegradation occurs rapidly in these sites when bacteria had frequently been exposed to release from ballast water tanks. Such well-known site which is often expose to oil contamination is Brittany shoreline. Atlas [6] has reported that after Tanio oil spills the degradation of hydrocarbons was detectable within 24 h, whereas in sites not exposed to petroleum, biodegradation occurred after a significant lag period, typically of the order of 2 to 4 weeks.

There are many factors limiting the biodegradation rate of hydrocarbons in marine environment. The most important are phosphate and nitrogen (ammonium, nitrate and organic nitrogen) concentrations. Venosa et al. [89] suggest that manipulating the supply of N

and P may result in different microbial populations. Smith et al. [83] observed two distinct optima for phenanthrene degradation in regard to supply ratio of N:P of 5:1 and 20:1. This results indicated that under these conditions, two different phenanthrene-degrading bacterial populations with different nutrient requirements were selected or that different catabolic pathways were induced in the same population. Due to very low concentration of these nutrients in marine environments various types of fertilizers might be applied. One of the most popular is oleophilic fertilizer Inipol EAP22, containing urea as a nitrogen source, laureth phosphate as a phosphate source and oleic acid as a carbon source. This fertilizer was used in a field test after the most studied environmental accident in history, the Exxon Valdez oil spillage in Prince William Sound in March 1989, when over 1 mln barrels of crude oil contaminated the open water of sound and shorlines. The application of Inipol EAP22 and other fertilizers such as Customblen and isobutylenediurea was successful and proved a good bioremediation strategy. Within 10 days after treatment the oil-blackened rocks on the shoreline turned white and appeared to be free of surface oil. Nutrient addition can stimulate 3–5 times the rate of oil biodegradation in comparison to conditions with lack of nutrients. The greatest stimulation may be achieved by higher levels of nutrients addition, but this may caused eutrophication with algae blooms and even may be toxic to marine organisms [6]. In turn, Venosa et al. [89] studying the degradation of oil in a sandy beach in Delaware, USA, observed the enhanced degradation rates of alkanes 5-fold and toxic PAHs 1.5- to 2-fold. Bioremediation with fertilizers is an approach based on modification of environment. Another strategy used after oil spill is the addition of microorganisms, called seeding, that are capable of degrading hydrocarbons. Although seeding failed in the case of Exxon Valdez spill, successful biotreatment using commercial seed cultures Alpha, after Maga Borg spill of the Texas coast was reported [48]. Each shoreline has its own sensitivity to oil and clean-up activities. Four major factors are considered in the sensitivity ranking: relative exposure to, or shelter from waves; shoreline slope; substrate type (grain size, mobility, penetration ability to support traffic) and biological productivity and sensitivity. Wave-swept rocky coast recovery quickly from oil spills whereas marshes and mangroves do not [49].

7. Bacteria in phytoremediation

Phytoremediation means the use of plants to reduce contaminant level in soil. It has been suggested as an alternative method to clean-up polluted soils compared

to expensive excavation techniques combined with on/off-site treatment of deposition. It is based on the stimulation of rhizosphere hydrocarbon-degrading microorganisms by plant [85, 87]. Siciliano et al. [83] point two mechanisms by which plants increase catabolic activity in the rhizosphere or non-rhizosphere soil. The first relies on the enhancement of general microbial activity due to the release of plant lysates and root exudates. The second one results from the proliferation of the specific microbial groups as the microbial community size increases due to rhizosphere effect. Roots provide an ideal attachment site for microorganisms and soil surrounding roots is very rich with organic compounds such as amino acids, organic acids, sugars, carbohydrates and vitamins. Between plants and rhizospheric bacteria specific associations are formed that may increase the degradation of hazardous organic pollutants in soil. Generally, plant-bacteria interactions run on root exudates composition and pattern of root exudates depends on plant species and the stage of plant development. For example, root exudates of phenolic compounds, which induce toluene monooxygenase has been postulated to be the mechanism by which plants stimulate the degradation of trichloroethylene in soil [3]. Root exudates can increase contaminant bioavailability by competing with the contaminant for binding sites on the soil particles. The addition of the solution of low molecular weight acids (succinic and formic) to rhizosphere soil increased the initial degradation rate of pyrene [66]. Moreover, the root exudates and associated microbial communities are likely to be a site-time-plant specific phenomenon [81]. It has been shown that rhizobacteria including genera *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* can degrade a variety of hydrocarbons [63, 67]. For example, populations of benzene, toluene, and xylene degrading bacteria were 5-fold higher in the rhizosphere of poplar trees than in non-rhizosphere soil [35]. Radwan et al. [63] found that root of several desert plants were densely associated with hydrocarbon degraders.

During phytoremediation both plants and microorganisms take part in the degradation process, either independently or through synergistic effects. Bacteria can reduce the phytotoxicity of hydrocarbons by degrading compounds or do not degrade these compounds. Siciliano and Germida [81] found that inoculating Daurian wild rye with two pseudomonads allowed plant to grow in soil contaminated with a mixture of 2,3-dichlorobenzoic acid and 3-chlorobenzoic acid, but did not decrease levels of these contaminants in soil. In turn, Pfender [61] observed that inoculation of *Panicum milaceum* L. with *Pseudomonas* strain SR3, resulted in the reduc-

tion of phytotoxicity of polychlorinated phenols (PCP), due to utilization of PCP by this strain.

A new approach of enhancing phytoremediation is to engineer plants. This strategy is based on the alteration of plants such that their roots exudates favour a subset of rhizobacterial community with desired properties [57]. Many hazardous pollutants such as aromatic compounds or trichloroethylene are degraded by enzymes induced by phenol or biphenyl occurred in root exudates. Changes of amount of phenolic compounds secreted by roots may result in enhanced degradation of trichloroethylene [3]. The increasing biodegradative activity of rhizosphere may be achieved also by supplying of specific carbon source that establish communities responsible for degradation of the contaminants. However, phytoremediation is a promising method of removing many hydrocarbons from soil but due to the complexity the interactions plant-microorganisms it is difficult to control and predict the final results.

8. Monitoring of bioremediation

To assess the results of biological remediation it is not only sufficient to measure remaining contaminants content in environment, but also it is necessary to detect and monitor the target bacteria, activity of enzymes involved in degrading processes, changes in bacterial diversity and survival of introduced exogenous microorganisms [46, 96]. The conventional methods based on the cultivation techniques used for analysis of structure and dynamics of microbial community are not sufficient for monitoring of efficiency of bioremediation. Detection methods based on culturing of bacteria, which generally rely on the use of added or intrinsic markers, serve to monitor the fate only of the culturable fractions of introduced bacteria. Therefore, for this purpose it is necessary to use different molecular techniques. The most popular methods based on DNA or RNA nucleic acids extracted directly from soil samples offer the possibility to monitor the fate of the heterologous genes introduced, including that following the horizontal gene transfer.

Recently, for detection and monitoring of target bacteria which are directly related to the degradation of pollutants fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA and *in situ* PCR have been successfully used. FISH is a rapid molecular technique whereby microorganisms are directly visualized and identified using fluorochrome-labeled oligonucleotide probes that specifically target the 16S rRNA with occur in high copy number in actively growing bacteria. This method allows to analyse bacterial community structure, spatial and temporal dynamics of individual microbial population in their habitat [2]. FISH has been used

to monitor the changes in bacteria community structure and physiological state during industrial phenol degradation [97]. Du Teau et al. [19] applied FISH for direct counting of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. JS150 and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 throughout a phenol biodegradation experiments. In turn, Watanabe et al. [94] using FISH characterized the unique bacterial population in petroleum contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities.

The single cell level detection in ecological studies may be achieved by *in situ* PCR. This is a modification of PCR method in which amplification and detection of target genes are carried out inside individual bacterial cells. This approach allows to find individual functional genes occurring in single copy or low copies number in intact bacterial cell [32]. Species-specific detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Serratia marcescens*, hydrocarbon-utilizing bacteria was used for monitoring the presence of these bacteria in environmental water sample [100]. Another example of using quantitative PCR is experiment carried out by Nakamura et al. [54] who monitored the number of *Ralstonia eutropha* KT-1 during field experiments of bioaugmentation in trichloroethylene-contaminated groundwater.

A real challenge for microbial ecologists studying the bioremediation processes is to monitor changes in bacterial diversity in microbial soil communities during hydrocarbon degradation. The useful and convenient molecular methods for this purpose are denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) of PCR amplified 16S rDNA, and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). In DGGE and TGGE methods, PCR amplified 16S rDNA fragments from bacterial community are separated into discrete bands in a polyacrylamide gel containing a linearly increasing gradient of DNA denaturant or by applying a temperature gradient during the electrophoretic separation, respectively. DGGE/TGGE fingerprinting of 16S rDNA have been used to examine the effects of shock loads of toxic phenol mixtures and the introduction of exogenous phenol-degrading bacteria into activated sludge communities [20]. Some researchers have successfully monitored the changes in bacterial diversity by DGGE during anaerobic benzene degradation in a petroleum contaminated aquifer [71] and bioremediation of a controlled oil spill field experiments [43]. T-RFLP method represents an appropriate technique for monitoring highly diverse soil bacterial communities. It is based on using fluorescence-labeled primer to amplify a selected region of bacterial genes encoding 16S

rRNA from bacterial community. The PCR products are digested with restriction enzymes and the fluorescence-labeled terminal restriction fragment is precisely measured by DNA sequencer. For example, Liu et al. [42] and Mills et al. [50] used T-RFLP method to monitor the impact of nutrient amendments on microbial community dynamics and structural diversity during bioremediation of petroleum contaminated sites and in contaminated aquifer samples.

Apart from molecular approaches, for monitoring bioremediation processes in soil contaminated with hydrocarbons methods based on the soil biological activities are used. The most useful instrument in this field seems to be respiratory measurements and activities of soil enzymes such as dehydrogenase, urease, catalase and lipase. Margesin et al. [46] have demonstrated for the first time that soil lipase activity is an excellent indicator for monitoring oil decontamination. Contrary to activities of soil dehydrogenase, catalase and urease which increased immediately after oil contamination and decreased at low hydrocarbon concentration, lipase activity was low at high hydrocarbon content but stimulated with decreasing contaminant content.

9. Conclusions

In conclusion, the application of bacteria in bioremediation makes it more safely and environmentally friendly technology, particularly for a dealing with hydrocarbon contamination. The main advantage of bioremediation is that it can be done on site, is often less expensive and site disruption is minimal, it eliminates contaminants permanently, eliminates long-term liability and has greater public acceptance. Bioremediation has also its limitations. One difficulty is that bioremediation is carried out in environment which contains diverse uncharacterized bacteria. Another difficulty is that some pollutants are not amenable to bioremediation or are transformed to toxic metabolites. Moreover, many environmental factors limit the use of bioremediation in specific circumstances. Therefore, the effectiveness of the bioremediation will depend on the success in establishing bacterial diversity, identifying the limiting factors and optimizing them in the feasibility studies. In future studies a special attention should be focused on deeper understanding of the ecology of pollutant degradation and phytoremediation. The application of new different strategies, both physiological and molecular, will give precisely insight into microbial community structure and fate of bacteria involving in hydrocarbon degradation.

References

- Allard A.S., Neilson A.H.: Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **39**, 253–285 (1997)
- Amann R., Glöcker F.O., Neef A.: Modern methods in sub-surface microbiology – *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 191–200 (1997)
- Anderson T.A., Walton B.T.: Comparative fate of [¹⁴C]trichloroethylene in the root zone of plants from a former solvent disposal site. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 2041–2047 (1995)
- Annweiler E., Richnow H.H., Antranikian G., Hebenbrock S., Garms C., Franke S., Francke W., Michaelis W.: Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 518–523 (2000)
- Atlas R.M.: Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45**, 180–209 (1981)
- Atlas R.M.: Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **31**, 178–182 (1995)
- Barathi S., Vasudevan N.: Bioremediation of crude oil contaminated soil by bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* SN1. *J. Environ. Sci. Health Part A*, **38**, 1857–1866 (2003)
- Barbieri S. M.: Regulation and expression of degradative plasmids in *Pseudomonas*. *Ciencia e Cultura*, **42**, 317–324 (1990)
- Boopathy R.: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* **74**, 63–67 (2000)
- Boopathy R.: Anaerobic biotransformation of carbon tetrachloride under various electron acceptor conditions. *Bioresour. Technol.* **84**, 69–73 (2002)
- Caldwell M.E., Tanner R.S., Suflita J.M.: Microbial metabolism of benzene and the oxidation of ferrous iron under anaerobic conditions: implications for bioremediation. *Anaerobe*, **5**, 595–603 (1999)
- Capelli S.M., Busalmen J.P., de Sanchez S.R.: Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **47**, 233–238, (2001)
- Chang B.V., Wu W.B., Yuan S.Y.: Biodegradation of benzene, toluene, and other aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. D8. *Chemosphere*, **35**, 2807–2815 (1997)
- Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philph P, Lovley D.R.: Anaerobic degradation of polycyclic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3589–3593 (1997)
- Coates J.D., Anderson R.T.: Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends Biotechnol.* **18**, 408–412 (2000)
- Dagley S.: Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **6**, 1–46 (1971)
- Dean-Ross D., Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E.: Metabolism of anthracene by *Rhodococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 205–211 (2001)
- Dojika M.A., Hugenholtz P., Haack S.K., Pace N.R.: Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated- solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3869–3898 (1998)
- DuTeau N.M., Rogers J.D., Bartholomay C.T., Reardon K.F.: Species-specific oligonucleotides for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. strain JS150, and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4994–4999 (1998)
- Eichner C.A., Erb R.W., Timmis K.N., Wagner-Dobler I.: Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 102–109 (1999)
- Erickson B.D., Mondello F.J.: Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multi component polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* **174**, 2903–2912 (1992)
- Futamata H., Harayama S., Watanabe K.: Group-specific monitoring of phenol-hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4671–4677 (2001)
- Gibson D.T., Resnick S.M., Lee K., Brand J.M., Torok D.S., Wackett L.P., Schocken M.J., Haigler B.E.: Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816–4. *J. Bacteriol.* **177**, 2615–2621 (1995)
- Gogoi B.K., Dutta N.N., Goswami P., Mohan T.R.K.: A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Adv. Environ. Res.* **7**, 767–782 (2003)
- Grinmberg S.J., Stringfellow W.T., Aitken M.D.: Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2387–2392 (1996)
- Harayama S.: Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 268–273 (1997)
- Harayama S., Kok M., Neidle E.L.: Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 565–602 (1992)
- Head, I.M., Swannell R.P.J.: Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 234–239 (1999)
- Hoepfel R.E., Hinchey R.E.: Enhanced bioremediation for on-site remediation of contaminated soils and ground water. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* **6**, 311–331 (1994)
- Hollowell G.P., Kuykendall L.D., Gillette W.K., Hashem F.M., Hou L-H., Tatem H.E., Dutta S.K.: Genetic transfer and expression of plasmid RP4: TOL in *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1811–1819 (1999)
- Hooker B.S., Skeen R.S.: Intrinsic bioremediation: an environmental restoration technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 317–320 (1996)
- Iwamoto T., Nasu M.: Current bioremediation practice and perspective. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 1–8 (2001)
- Johnson S.J., Woolhouse K.J., Prommer H., Barry D.A., Christofi N.: Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. *Eng. Geol.* **70**, 343–349 (2003)
- Jones W.R.: Practical applications of marine bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 300–304 (1998)
- Jordahl J.L., Foster L., Schnoor J.L., Alvarez P.J.J.: Effect of hybrid poplar trees on microbial population important to hazardous waste bioremediation. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1318–1321 (1997)
- Kanally R.A., Harayama S.: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **182**, 2059–2067 (2000)
- Kasai Y., Kishira H., Harayama S.: Bacteria belonging to the genus *Cyclostaticus* play a primary role in the degradation of

- aromatic hydrocarbon released in a marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5625–5633 (2002)
38. Kogure K., Simidzu U., Kaga T.: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 415–420 (1979)
 39. Kumararu T., Suenaga H., Mitsuoka M., Watanabe T., Furukawa K.: Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by direct evolution of biphenyl dioxygenase. *Nature Biotechnol.* **16**, 663–666 (1998)
 40. Lang S., Wullbrand D.: Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 22–32 (1999)
 41. Li G., Huang W., Lerner D.N., Zhang X.: Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Res.* **34**, 3845–3853 (2000)
 42. Liu W.-T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J.: Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516–4522 (1997)
 43. MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C.: Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3566–3574 (1999)
 44. Madsen E.L., Sinclair J.L., Ghiorse W.C.: *In situ* biodegradation: microbiological patterns in a contaminated aquifer. *Science*, **252**, 830–833 (1991)
 45. Madsen E.L.: Methods for the determining biodegradability (in) *Manual of environmental microbiology*, eds. Hurst C.J., Knudsen G.R., Mc Inerney M.J., Stetzenbach L.D., Walter M.V., ASM Press, Washington, 1997, pp. 753–757
 46. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F.: Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, **40**, 339–346 (2000).
 47. Margesin R., Schinner F.: Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3127–3133 (2001)
 48. Mauro G.: Mega Borg spill of the Texas coast: a report on the effects on bioremediation. Bioremediation Symposium, Lamar University, Beaumont, USA, 1990
 49. Mearns A.J.: Cleaning oiled shores: putting bioremediation to the test. *Spill Sci. Technol. Bull.* **4**, 209–217 (1997)
 50. Mills D.K., Fitzgerald D.K., Litchfield C.D., Gillevet P.M.: A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *J. Microbiol. Meth.* **54**, 57–74 (2003)
 51. Moller J., Ingvorsen H.: Biodegradation of phenanthrene in soil microcosms stimulated by an introduced *Alcaligenes* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 271–278 (1993)
 52. Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E.: Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1476–1483 (2001)
 53. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S.: Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Pol. J. Environ. Stud.* **12**, 15–25 (2003)
 54. Nakamura K., Ishida H., Iizumi T., Shibuya K., Okamura K.: Quantitative PCR-detection of a phenol-utilizing bacterium, *Ralstonia eutropha* KT-1, injected to a trichloroethylene-contaminated site. *Environ. Eng. Res.* **37**, 267–278 (2000)
 55. Navon-Venezia S., Banin E., Ron E.Z., Rosenberg E.: The bioemulsifier alasan: role of protein in maintaining structure and activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 382–284 (1998)
 56. Neilson A.H., Allard A.S.: Microbial metabolism of PAHs and heteroarenes (in) *The handbook of environmental chemistry*, ed. Neilson, A.H. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 1998, pp 1–64
 57. O'Connell K.P., Goodman R.M., Handelsman J.: Engineering the rhizosphere: expressing a bias. *Trends Biotechnol.* **14**, 83–88 (1996)
 58. Olsen R.A., Bakken L.R.: Viability of soil bacteria, optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbiol. Ecol.* **13**, 59–74 (1987)
 59. Pavel H., Shingler V.: An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **176**, 7550–7557 (1994)
 60. Peters M., Heinaru E., Talpsep H., Ward H., Stottmeister U., Heinaru A., Nurk A.: Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheAB, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4899–4906 (1997)
 61. Pfender W.F.: Bioremediation bacteria to protect plants in pentachlorophenol-contaminated soil. *J. Environ. Qual.* **25**, 1256–1260 (1996)
 62. Pinyakong O., Habe H., Supaka N., Pinpanichkarn P., Juntongjin K., Yoshida T., Furihata K., Nojiri H., Yamane H., Omori T.: Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 115–121 (2000)
 63. Radwan S.S., Awadhi H., Sorkhoh N.S., El-Nemr I.M.: Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwaiti desert. *Microbiol. Res.* **153**, 247–251 (1998)
 64. Ramos-Gonzales M.J., Duque E., Ramos J.L.: Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: Host range of *Pseudomonas putida* TPL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3020–3027 (1991)
 65. Raymond R.L., Hudson J.O., Jamison V.W.: Oil degradation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 522–535 (1996)
 66. Reilley K.A., Banks M.K., Schwab A.P.: Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* **25**, 212–219 (1996)
 67. Riser-Roberts E.: Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 1998, p. 134
 68. Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Haahtela K.: Means to improve the effect of *in situ* bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environ. Pollut.* **107**, 179–185 (2000)
 69. Ron E.Z., Rosenberg E.: Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 249–252 (2002)
 70. Ronchel M.C., Ramos C., Jensen L.B., Molin S., Ramos J.L.: Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2990–2994 (1995)
 71. Rooney-Varga J.N., Anderson R.T., Fraga J.L., Ringelberg D., Lovley D.R.: Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3056–3063 (1999)
 72. Samanta S.K., Chakraborti A.K., Jain R.K.: Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 98–107 (1999)

73. Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* **20**, 243–248 (2002)
74. Saylor G.S., Ripp S.: Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 286–289 (2000)
75. Seech A.: Biodegradation of pentachlorophenol in soil: response to physical, chemical, and biological treatments. *Can. J. Microbiol.* **37**, 440–444 (1991)
76. Semprini L., Kitanidis P.K., Kampbell D.H., Wilson J.T.: Anaerobic transformation of chlorinated aliphatic hydrocarbons in a sand aquifer based on spatial chemical distributions. *Water Resour. Res.* **31**, 1051–1062 (1995)
77. Shields M.S., Reagan M.J., Gerger R.R., Compbell R., Somerville C.: TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* GH. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1352–1356 (1995)
78. Shingler V., Pawlowski J., Marklund U.: Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**, 711–724 (1992)
79. Shingler V., Moore T.: Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **176**, 1555–1560 (1994)
80. Show L.E., Williams P.A.: Physical and functional mapping of two cointegrate plasmids derived from PR4 and TOL plasmid pDK1. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2463–2474 (1998)
81. Siciliano S.D., Germida J.J.: Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ. Res.* **6**, 65–79 (1998)
82. Siciliano S.D., Germida J.J., Banks K., Greer C.W.: Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 483–489 (2003)
83. Smith V.H., Graham D.W., Cleland D.D.: Application of resource ratio theory to hydrocarbon degradation. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3386–3395 (1998)
84. Stormo K.E., Crawford R.L.: Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 727–730 (1992)
85. Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C.: Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **18**, 647–658 (2002)
86. Teramoto M., Futamata H., Harayama S., Watanabe K.: Characterization of a high-affinity phenol hydroxylase from *Comamonas testosteroni* R5 by genes cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 552–558 (1999)
87. Tesar M., Reichenauer T.G., Sessitsch A.: Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 1883–1892 (2002)
88. U.S. EPA, Bioremediation of hazardous wastes sites: practical approaches and implementation. (EPA/ 625/K-96/001 May 1996)
89. Venosa A.D., Suidan M.T., Wrenn B.A., Strohmeier K.L., Haines J.R., Eberhart B.L., King D., Holder E.: Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1764–1775 (1996)
90. Vogel T.M.: Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 311–316 (1996)
91. Volkering F., Breure A.M., Andel J.G., Rulkens W.H.: Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1699–1705 (1995)
92. Walter M.W.: Bioaugmentation (in) Manual of environmental microbiology, eds. Hurst C.J., Knudsen G.R., Mc Inerney M.J., Stetzenbach L.D., Walter M.V. ASM Press, Washington, 1997, pp. 753–757
93. Watanabe K.: Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 237–241 (2001)
94. Watanabe K., Watanabe K., Kodama M.Y., Syutsubo M.K., Harayama S.M.: Molecular characterization of bacterial population in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4803–4809 (2000)
95. Watanabe K., Futamata H., Harayama S.: Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategy. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 655–663 (2002)
96. Watanabe K., Hamamura N.: Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 289–295 (2003)
97. Whiteley A.S., Baile M.J.: Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2400–2407 (2000)
98. Wiesel I., Wubker S.M., Rehm H.J.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 110–116 (1993)
99. Williams P.A., Sayers J.R.: The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*, **5**, 195–217 (1994)
100. Wilson V.L., Tatford B.C., Yin X., Rajki S.C., Walsh M.M., LaRock P.: Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **39**, 59–78 (1999)
101. Yakimov M.M., Golyshin P.N., Lang S., Moore E.R., Abraham W.R., Lunsdorf H., Timmis K.N.: *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 339–348 (1998)

AKTYWNOŚĆ PRZECIWWIRUSOWA SUBSTANCJI POCHODZENIA NATURALNEGO ORAZ ICH POCHODNYCH

Ewa Krawczyk, Mirosław Łuczak

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Akademia Medyczna w Warszawie
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, tel. (22) 6220028, e-mail: ewakrawczyk@gazeta.pl

Wpłynęło w sierpniu 2004 r.

1. Wstęp. 2. Aktywność przeciwwirusowa preparatów roślinnych. 3. Aktywność przeciwwirusowa związków chemicznych pochodzenia naturalnego. 3.1. Flawonoidy. 3.2. Polisacharydy. 3.3. Antrachinony. 3.4. Terpeny. 3.4.1. Monoterpeny. 3.4.2. Diterpeny. 3.4.3. Triterpeny. 3.4.4. Seskwiterpeny. 4. Metody badań aktywności przeciwwirusowej preparatów pochodzenia naturalnego. 5. Podsumowanie

Antiviral activity of natural compounds and their derivatives

Abstract: Common occurrences of frequently serious viral infections and a relatively small number of available antiviral chemotherapeutics necessitate research for new, biologically active substances, which might be used as antiviral drugs. Numerous natural compounds, e.g., derived from plants and fungi, which show significant and various biological activities, may be a source of potential drugs. Flavonoids, polysaccharides, anthraquinones, terpenes (monoterpenes, diterpenes, sesquiterpenes, triterpenes) as well as their derivatives, maybe as an example. These compounds possess a potent antiviral activity against many various viruses, RNA and DNA viruses, as well as enveloped and non-enveloped viruses. It appears therefore that further investigation of these groups of compounds and their derivatives is justified because they may constitute a potential source of antiviral chemotherapeutics.

1. Introduction. 2. Antiviral activity of plant extracts. 3. Antiviral activity of natural chemical compounds. 3.1. Flavonoids. 3.2. Polysaccharides. 3.3. Anthraquinones. 3.4. Terpenes. 3.4.1. Monoterpenes. 3.4.2. Diterpenes. 3.4.3. Triterpenes. 3.4.4. Sesquiterpenes. 4. Methods of assessment of natural products' antiviral activity. 5. Summary

Słowo kluczowe:

Key words:

1. Wstęp

W ostatnich latach dwudziestego wieku stało się jasne, że coraz większe niebezpieczeństwo zaczyna grozić populacji ludzkiej ze strony zakażeń wirusowych. Problemem na całym świecie, a zwłaszcza w krajach rozwijających się jest ciągle zespół nabytego niedoboru odporności – AIDS. Mimo powiększającej się wciąż liczby leków przeciw ludzkiemu wirusowi upośledzenia odporności – HIV, rośnie liczba zakażonych tym wirusem. W obecnej chwili na świecie żyje około 40 milionów ludzi zakażonych HIV. Dotyczy to przede wszystkim kobiet i osób młodych, między 15. a 24. rokiem życia. Najwięcej zakażonych notuje się w krajach Afryki, gdzie zakażonych jest ponad 25 milionów ludzi. Zaczyna także wzrastać liczba zakażonych HIV w Europie Wschodniej, zwłaszcza w Rosji [93]. Problem stanowią także nowe lub pojawiające się w rejonach, gdzie ich dotąd nie notowano, szczepy wirusów, jak wirus Zachodniego Nilu, sprowadzony do Stanów Zjednoczonych w 1999 roku, który spowodował 8393 infekcje w USA [7], oraz koronawirus związany z wystąpieniem SARS (SARS-CoV), który wywołał

infekcje u ponad 8000 pacjentów w okresie od 1 listopada 2002 r. do 31 lipca 2003 r [95]. Ponadto, ogromny postęp w rozwoju technik medycznych i coraz częstsze korzystanie z takich metod terapeutycznych, jak transplantacje narządów czy szpiku kostnego, powoduje, że pacjenci poddawani silnej immunosupresji narażeni są na liczne infekcje wirusowe. Są to przede wszystkim zakażenia wirusami z rodziny *Herpesviridae* (np. wirusem cytomegalii – CMV) [25]. Infekcje wirusowe u pacjentów poddanych immunosupresji są zakażeniami o bardzo ciężkim przebiegu i często kończą się śmiercią [82].

Zakażenia wirusowe są jednak niebezpieczne nie tylko ze względu na ich przebieg, ale również ze względu na fakt, że współczesna medycyna nie dysponuje odpowiednią liczbą skutecznych leków przeciwwirusowych. Obecnie dostępnych jest ponad 30 leków przeciwwirusowych [17], należących do kilku grup. Głównymi grupami dostępnych obecnie leków przeciwwirusowych są: aminy cykliczne, inhibitory proteazy, nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy, analogi nukleozydów i nukleotydów, nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy, pochodne kwasu fosfoniowego i inne [16].

Leki te mają jednak poważne wady: działają raczej w wąskim spektrum, są często toksyczne i źle tolerowane przez pacjentów, ponadto jest ich po prostu zbyt mało, aby skutecznie leczyć wszystkie infekcje wirusowe [17]. Poważnym problemem jest również narastanie oporności wirusów na te leki, co sprawia, że niektóre szczepy wirusów niedawno jeszcze wrażliwe na terapię, przestają na nią reagować [40].

Kwestią niezwykle istotną staje się więc poszukiwanie nowych, skutecznych i mało toksycznych dla organizmu pacjenta leków przeciwwirusowych. Badania mające na celu odkrycie potencjalnych czynników o aktywności przeciwwirusowej prowadzone są obecnie dwukierunkowo. Jeden nurt badań obejmuje syntezę nowych pochodnych już istniejących leków przeciwwirusowych. Synteza chemiczna takich związków jest syntezą ukierunkowaną, mającą na celu wytworzenie nowego leku o właściwościach, z terapeutycznego punktu widzenia, korzystniejszych, niż lek obecnie stosowany. Ogromną grupą potencjalnych leków przeciwwirusowych powstających w taki sposób są analogi nukleozydów o aktywności skierowanej przeciw wirusom z rodziny *Herpesviridae* (wirusom opryszczki pospolitej – HSV-1 i HSV-2, wirusowi Epsteina-Barr – EBV, wirusowi ospy wietrznej-półpaśca – VZV, ludzkim herpeswirusom HHV-6 i HHV-8), a także przeciw wirusom należącym do rodzin: *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Hepadnaviridae* oraz *Retroviridae* [19]. Syntetyzowane są również nowe związki chemiczne – między innymi czynniki hamujące adsorpcję wirusa, inhibitory fuzji (analogi kwasu betulinowego), nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy, antagoniści koreceptorów, inhibitory replikazy RNA, inhibitory polimerazy DNA i wiele innych [18].

Drugi nurt poszukiwań nowych leków przeciwwirusowych stanowi badanie związków pochodzenia naturalnego, uzyskiwanych głównie z roślin, w kierunku uzyskania potencjalnych chemioterapeutyków.

Historia ludzkości dowodzi, że preparaty ze świeżych surowców roślinnych były znane już od starożytności. Mówią o nich: papirus Ebersa, spisany w Egipcie około 1550 r. p.n.e., podający przepisy na wykonanie leków ze świeżych roślin, pisma Hipokratesa z Kos z V–IV w. p.n.e., oraz Klaudiusza Galena, twórcy nauki „o sporządzaniu leków z roślin świeżych lub ziół”. Również receptariusze średniowieczne i receptariusze lekarzy oświecenia zalecają stosowanie świeżych roślin w celach leczniczych oraz podają przepisy na przetwory z roślin. Jednak synteza kwasu salicyłowego (w 1874 r.) zapoczątkowała „erę leków syntetycznych” i krótkotrwałe załamanie się ziołolecznictwa, w tym również zainteresowania preparatami leczniczymi ze świeżych roślin [34]. W połowie dwudziestego wieku w znacznym stopniu odrzucono pro-

dukty roślinne jako źródło potencjalnych leków. Uważano, że poszukiwania takie są mało efektywne i nieekonomiczne [91]. Natomiast w chwili obecnej istnieje ogromny nacisk ze strony nie tylko lekarzy, ale i pacjentów, na firmy farmaceutyczne, aby te produkowały leki pochodzące z naturalnych źródeł [69]. Na całym świecie w niezwykle szybkim tempie wzrasta liczba stosowanych w terapii preparatów roślinnych oraz substancji aktywnych otrzymywanych głównie z roślin, a także z grzybów czy gąbek. Produkcja leków naturalnego pochodzenia jest jedną z głównych gałęzi przemysłu farmaceutycznego. Szacuje się, że do 40% nowych, używanych powszechnie leków wywodzi się ze źródeł naturalnych, a stosowane są zarówno substancje naturalne, jak i ich wersje uzyskiwane syntetycznie [35].

2. Aktywność przeciwwirusowa preparatów roślinnych

Wyniki wielu badań naukowych potwierdzają, że wiele roślin stosowanych w tzw. tradycyjnej medycynie wykazuje aktywność przeciwwirusową. W Europie po raz pierwszy zainteresowano się nimi po zakończeniu II wojny światowej. W 1952 roku w Nottingham w Wielkiej Brytanii przebadano 288 ekstraktów roślinnych w kierunku ich ewentualnego działania przeciw wirusowi grypy. Dwanaście z nich zahamowało namnażanie wirusa [8]. W latach siedemdziesiątych XX wieku badacze kanadyjscy stwierdzili aktywność przeciwwirusową soku winogronowego, soku jabłkowego, czerwonego wina oraz herbaty. Napoje te inaktywowały takie wirusy, jak: poliovirus typu 1, wirus Coxsackie B5 oraz HSV [44, 45, 46].

W ciągu kolejnych lat coraz więcej laboratoriów na całym świecie prowadziło prace badawcze nad ekstraktami uzyskiwanymi z roślin i ich biologicznymi właściwościami.

W laboratoriach znajdujących się na terenie Brazylii, po przebadaniu 54 gatunków roślin leczniczych stosowanych w medycynie ludowej przez ludność Brazylii, u ponad połowy stwierdzono właściwości przeciwwirusowe. 42,6% ekstraktów roślinnych hamowało replikację HSV-1, 42,6 % ekstraktów – replikację HSV-2, 26% – poliovirusa typu 2, a 24% – VZV. Większość aktywnych roślin należała do rodzin *Asteraceae* i *Lamiaceae*, a najsilniejszy efekt przeciwwirusowy i najszersze spektrum przeciwwirusowe posiadały ekstrakty roślin należących do gatunków *Cunila spicata* i *Trixis praestans* [83].

Argentyńscy naukowcy przebadali liczne wyciągi z roślin stosowanych w tradycyjnej medycynie tego kraju. W stosunku do HSV-1 aktywny okazał się ekstrakt z rdestu *Polygonum punctatum* oraz wyciągi z *Lithraea*

molleoides, *Sebastiania brasiliensis* i *Sebastiania klotzschiana*. Ekstrakty z *P. punctatum*, *L. molleoides*, a także *Myrcianthes cisplatensis* wykazały aktywność przeciwwirusową wobec syncytialnego wirusa oddechowego (RSV) [48]. Okazało się także, iż ekstrakty z rośliny spotykanej w Ameryce Południowej (*Baccharis trinervis*) wykazały silne działanie hamujące namnażanie HIV *in vitro*, w stężeniu nietoksycznym dla komórek MT-2 [72].

Natomiast produkty z niektórych roślin stosowanych w tradycyjnej medycynie Polinezji (*Scaevola sericea*, *Psychotria hawaiiensis*, *Pipturus albidus* i *Eugenia malaccensis*) wykazywały aktywność wobec HSV-1, HSV-2 i wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) [54].

W Kolumbii Brytyjskiej w Kanadzie przetestowano aktywność przeciwwirusową ekstraktów uzyskiwanych ze stu roślin leczniczych. Bardzo silne właściwości hamujące namnażanie koronawirusów posiadał ekstrakt ze świdośliwy olcholistej *Amelanchier alnifolia*, a wyciąg z korzenia *Lomatium dissectum* hamował powstawanie efektu cytopatycznego wywołanego przez rotawirusy. Wyciągi z gałęzi dzikiego bzu korolowego *Sambucus racemosa* oraz z korzenia pięciornika *Potentilla arguta* hamowały namnażanie RSV, a ekstrakt uzyskiwany z *Ipomopsis aggregata* – wirusa parainfluenzy typu 3. W stosunku do HSV-1 aktywność wykazały wyciągi z rzeżuchy *Cardamine angulata*, wątrobowca *Conocephalum conicum* i dziewanny drobnokwiatowej *Verbascum thapsus* [61].

Substancje pochodzenia roślinnego były również szeroko stosowane w tradycyjnej medycynie Wschodu. Badacze japońscy potwierdzili, że Kakkon-to, lek ziołowy, używany w leczeniu zakażeń w Chinach i Japonii, istotnie wykazuje działanie przeciwwirusowe, redukując zmiany skórne powodowane przez HSV-1 oraz zmniejszając śmiertelność myszy zakażonych tym wirusem [66]. Inny lek stosowany w ludowej medycynie Chin, Kanzo-bushi-to, stymulował odporność myszy na zakażenie HSV-1 [58]. Zahamowanie replikacji HSV-1 *in vitro* wykazał wyciąg z chińskiej rośliny leczniczej *Psychotria serpens* [50]. Kilkanaście gatunków roślin stosowanych w medycynie ludowej w prowincji Yunnan w Chinach wykazało aktywność przeciwwirusową w stosunku do wirusa Sindbis i mysiego cytomegalowirusa [99]. Natomiast spośród 204 przebadanych ekstraktów roślinnych, powszechnie używanych w medycynie Japonii, 45 zahamowało wpływ HIV na komórki MT-4. Najsilniejsze działanie przeciwwirusowe wykazał wyciąg z korzenia nawrotu *Lithospermum erythrorhizon* oraz wyciąg z głowienki pospolitej *Prunella vulgaris* [98].

Badacze testujący pod kątem aktywności przeciwwirusowej rośliny stosowane w leczeniu zakażeń w tradycyjnej medycynie Nepalu, stwierdzili aktywność eks-

traktów uzyskiwanych z różnych gatunków *Lygodium*, *Maesa*, *Bauhinia*, *Carissa* i dziurawca *Hypericum* wobec wirusa Sindbis, poliovirusa i HSV [90].

Ekstrakty z roślin stosowanych w tradycyjnej medycynie afrykańskiej okazały się aktywne wobec HIV. Spośród przebadanych 41 ekstraktów roślinnych, wyciągi z owoców liściokwiatu garbnikowego *Phyllanthus emblica*, dębu szypułkowego *Quercus pedunculata*, szczawiu *Rumex cyprius* i innych roślin wykazały wpływ hamujący na odwrotną transkryptazę tego wirusa [62].

Natomiast aktywność wobec poliovirusa typu 1 oraz ludzkiego cytomegalowirusa wykazały wyciągi z roślin stosowanych przez aborygenów w Australii. Wyciągi z *Pterocaulon sphacelatum* oraz z korzenia *Dianella longifolia* hamowały namnażanie poliovirusa typu 1, a wyciągi z wilczomlecza *Euphorbia australis* oraz z *Scaevola spinescens* – namnażanie CMV [75].

Podobne badania prowadzone są również w Europie. Niemieccy badacze stwierdzili, że wyciąg uzyskiwany z korzeni *Eleutherococcus senticosus* hamował replikację wirusów RNA: rinowirusa, RSV oraz wirusa grypy A; nie zahamował natomiast namnażania wirusów DNA – adenowirusa 5 i HSV-1 [28].

Badaczka bułgarska Serkedjieva i wsp. [78, 80] wykazali aktywność ekstraktów uzyskiwanych z bodziszka czerwonego *Geranium sanguineum*, stosowanego w ludowej medycynie Bułgarii, w stosunku do wirusów: grypy, HSV, krowianki oraz HIV-1 *in vitro*. Namnażanie wirusów grypy A i B, a także HSV zostało również zahamowane poprzez wpływ wyciągu z kwiatów dziewanny wielkokwiatowej *Verbascum thapsiforme* [100].

Również badania polskich naukowców pokazują, że naturalne produkty roślinne wykazują działanie przeciwwirusowe. Przykładem może być stwierdzona aktywność olejku z drzewa herbacianego (*Melaleuca alternifolia*) w stosunku do wirusa opryszczki oraz wirusa grypy [39].

Ogromnym obiecującym źródłem potencjalnych leków przeciwwirusowych jest roślinność morska. Ekstrakty wodne, uzyskiwane z glonów rosnących u wybrzeży Morza Czarnego w Bułgarii hamowały replikację *in vitro* wirusów HSV-1 i HSV-2 (ekstrakt z krasnorostu rurecznicy *Polysiphonia denudata*) a także hamowały namnażanie HSV-1 na komórkach Vero oraz opóźniały powstawanie efektu cytopatycznego na komórkach MT-4 zakażonych HIV (wyciąg z okrzemki *Haslea ostrearia*) [4, 79]. Aktywność w stosunku do HIV, jak również HSV wykazywały także ekstrakty z wielu glonów [73]. Ponadto, wyciągi z różnych glonów spotykanych na wybrzeżu Morza Czarnego wykazywały aktywność wobec wirusa grypy [81]. Wiele danych zebrano w tabeli I.

Aktywność przeciwwirusowa preparatów roślinnych

Badane rośliny (preparaty roślinne)	Wirusy, w stosunku do których preparaty były aktywne	Sposób działania	Piśmiennictwo
Sok winogronowy, sok jabłkowy, czerwone wino, herbata	poliowirus typu 1, wirus Coxsackie B5, HSV	inaktywacja wirusów	[45, 46, 47]
<i>Cunilla spicata</i> , <i>Trixix praestans</i>	HSV-1, HSV-2, poliowirus typu 1, VZV	hamowanie namnażania wirusów	[83]
<i>Polygonum punctatum</i> , <i>Lithraea molleoides</i>	HSV-1, RSV	hamowanie namnażania	[49]
<i>Baccharis trinervis</i>	HIV	hamowanie namnażania	[72]
<i>Scaevola sericea</i> , <i>Psychotria hawaiiensis</i> , <i>Pipturus albidus</i> , <i>Eugenia malaccensis</i>	HSV-1, HSV-2, VSV	hamowanie namnażania	[55]
<i>Amelanchier alnifolia</i>	koronawirusy	hamowanie namnażania	[62]
<i>Lomatium dissectum</i>	rotawirusy	hamowanie namnażania	[62]
<i>Sambucus racemosa</i> , <i>Potentilla arguta</i>	RSV	hamowanie namnażania	[62]
<i>Ipomopsis aggregata</i>	wirus parainfluenzy typu 3	hamowanie namnażania	[62]
<i>Cardamine angulata</i> , <i>Conocephalum conicum</i> , <i>Verbascum thapsus</i>	HSV-1	hamowanie namnażania	[62]
Kakkon-to (mieszanka ziół, stosowana w tradycyjnej medycynie Chin i Japonii)	HSV-1	redukcja zmian skórnych, zmniejszenie śmiertelności zakażonych myszy	[67]
<i>Psychotria serpens</i>	HSV-1	hamowanie namnażania	[51]
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> , <i>Prunella vulgaris</i>	HIV	hamowanie namnażania	[98]
różne gatunki <i>Lygodium</i> , <i>Maesa</i> , <i>Bauhinia</i> , <i>Carissa</i> , <i>Hypericum</i>	wirus Sindbis, poliowirus, HSV	hamowanie namnażania	[90]
<i>Phyllanthus emblica</i> , <i>Quercus pedunculata</i> , <i>Rumex cyprius</i>	HIV	hamowanie aktywności odwrotnej transkryptazy	[63]
<i>Pteurocaulon sphacelatum</i> , <i>Dianella longifolia</i>	poliowirus typu 1	hamowanie namnażania	[75]
<i>Euphorbia australis</i> , <i>Scaevola spinescens</i>	CMV	hamowanie namnażania	[75]
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	rinowirus, RSV, wirus grypy A	hamowanie namnażania	[30]
<i>Geranium sanguineum</i>	wirus grypy, HSV, wirus krowianki, HIV-1	hamowanie namnażania	[78, 80]
<i>Verbascum thapsiforme</i>	wirusy grypy A i B, HSV	hamowanie namnażania	[100]
<i>Melaleuca alternifolia</i>	HSV, wirus grypy	hamowanie namnażania	[39]
<i>Polysiphonia denudata</i>	HSV-1, HSV-2	hamowanie namnażania	[79]
<i>Haslea ostrearia</i>	HSV-1, HIV	hamowanie namnażania	[4]

3. Aktywność przeciwwirusowa związków chemicznych pochodzenia naturalnego

Ze względu na to, że w ostatnich latach odnotowuje się znaczny wzrost zainteresowania lekami pochodzenia naturalnego, poza uwzględnieniem pozytywnej strony tego zjawiska, należałoby również ocenić stopień ryzyka wynikający z ich powszechnego stosowania. W surowcach roślinnych, w ekstraktach o niedokładnie określonym składzie chemicznym obok substancji terapeutycznie aktywnych, występują liczne substancje towarzyszące. W związku z tym w trakcie stosowania terapii mogą wystąpić nieoczekiwane reakcje, zwłaszcza niezamierzone efekty farmakologiczne, jak

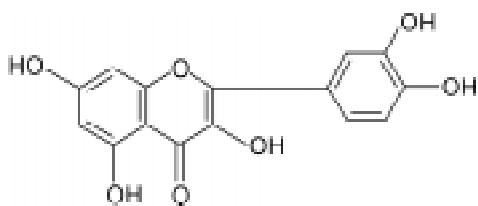
również niezamierzone interakcje stosowanych leków [13]. Istnieje więc tendencja do poszukiwania terapeutycznie aktywnych czystych związków chemicznych. Badania takie prowadzone są w licznych laboratoriach na całym świecie. Wynika z nich, że wśród związków chemicznych pochodzenia naturalnego o aktywności przeciwwirusowej dominują: flawonoidy, terpeny, polisacharydy, alkaloidy oraz peptydy [11, 35, 59].

3.1. Flawonoidy

Flawonoidy, zwane także bioflawonoidami, obejmują ogromną grupę substancji naturalnego pochodzenia (takich jak: flawony, flawonole, biflawonoidy, izo-

flawony, chalkony, lignany i flawonolignany, antocyjany i kumaryny) występujących w królestwie roślin. Są to związki o charakterze barwników, których podstawowy szkielet składa się z 15 atomów węgla, układających się w ugrupowaniu $C_6-C_3-C_6$. Olbrzymie rozpowszechnienie flawonoidów w przyrodzie dotyczy tylko niektórych typów ich budowy, jak glikozydy kwercetyny, kemferolu i luteoliny [43]. Uważa się, że naturalne flawonoidy wpływają ogólnie korzystnie na zdrowie człowieka i, dostarczane w pożywieniu, zapobiegają wielu chorobom. Działają przeciwzapalnie i przeciwhistaminowo, zmniejszając reakcje alergiczne. Hamują namnażanie wirusów, są silnymi przeciwutleniaczami, chronią układ krążenia i zapobiegają chorobom wieku starczego [56]. Przeciwwirusowa aktywność bioflawonoidów badana jest już od ponad trzydziestu lat.

Stwierdzono, że flawonoid chryzospelenol C (3,7,3'-trimetoksy-5,6,4'-trihydroksyflawon), występujący w używanej w ludowej medycynie aborygenów roślinie z gatunku *Pterocaulon sphacelatum* jest silnym i specyficznym inhibitorem replikacji pikornawirusów, w tym rinowirusów [76]. Synteza białek wirusowych oraz RNA pikornawirusów jest hamowana przez inny związek z grupy flawonoli – 3-metylokwercetynę [94]. Flawonoidy, jak kwercetyna (rys. 1) oraz hesperetyna blokują namnażanie poliovirusa typu 1, a także wirusa parainfluenzy typu 3, RSV oraz HSV-1 [38]. Uważa się, że w grupie bioflawonoidów flawonole (szczególnie kwercetyna i kamferol) wykazują większą aktywność przeciwwirusową, niż flawony (chryzyna, luteolina czy apigenina). Obie grupy flawonoidów działają również synergistycznie w stosunku do HSV-1 *in vitro*, a najskuteczniejszymi kombinacjami okazują się: kamferol + luteolina, kwercetyna + chryzyna, kamferol + apigenina oraz kwercetyna + apigenina [2]. Silnym inhibitorem replikacji wirusów HSV-1 i HSV-2 jest także flawonoid o nazwie resweratrol. Redukcja liczby zakaźnych cząstek wirusowych nie jest skutkiem jego bezpośredniego działania wirusobójczego, ani też zablokowania adsorpcji wirusów do komórek. Działanie resweratrolu prawdopodobnie polega na zablokowaniu wczesnych faz cyklu komórkowego, co wpływa na wstępne etapy replikacji wirusów opryszczki. Ponadto, resweratrol hamuje reaktywację wirusów HSV w zakażonych latentnie neuronach [22].



Rys. 1. Flawonoid – kwercetyna

Szeroko zakrojone badania wykazały, że pięć grup biflawonoidów (między innymi amentoflawon i robustaflawon), otrzymywanych z sumaka *Rhus succedanea* oraz z *Garcinia multiflora*, charakteryzowało się aktywnością wobec różnych wirusów, także wirusów oddechowych. Amentoflawon i robustaflawon silnie hamowały namnażanie wirusów grypy A i B, a także wirusów HSV-1 i HSV-2 [53]. Robustaflawon wykazał również aktywność wobec enzymu odwrotnej transkryptazy HIV-1 [52]. Inne biflawonoidy wpływały na replikację VZV oraz wirusa odry. Żaden ze związków chemicznych tej grupy nie hamował namnażania CMV [53]. Flawonoidami wpływającymi na replikację wirusa cytomegalii są natomiast flawonole o typie budowy kemferolu [64].

Inną, ważną terapeutycznie grupę bioflawonoidów stanowią lignany. Związki te, pochodne kwasu nordihydrogwaretynowego (NDGA), występującego w krzewach amerykańskich, głównie *Larrea divaricata*, hamują ekspresję genów ludzkiego wirusa brodawczaka (HPV-16) [12].

Prace nad przeciwwirusowymi właściwościami bioflawonoidów prowadzone były także w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie (wówczas Zakładzie Wirusologii Akademii Medycznej w Warszawie). Wykazano, że między innymi, flawonol kwercetyna oraz flawanon hesperydyna zmniejszały śmiertelność myszy zakażonych doświadczalnie wirusem zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (*Encephalomyocarditis virus* – EMC) [67], kwercetyna hamowała także namnażanie HSV-1 *in vitro* [96].

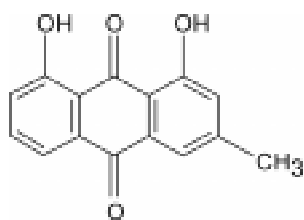
3.2. Polisacharydy

Aktywnością przeciwwirusową charakteryzują się również polisacharydy. Stwierdzono, że galaktany, uzyskiwane z wodorostów *Cryptopleura ramosa*, rosnących u wybrzeży Ameryki Południowej, są wybiórczymi inhibitorami adsorpcji wirusów HSV-1 i HSV-2 do komórek linii Vero [6]. Badacze, testujący inne polisacharydowe związki otrzymywane z roślin morskich stwierdzili również, że galaktany otrzymywane z wodorostów *Gymnogongrus torulosus*, hamują adsorpcję HSV-2 oraz wirusa dengi do komórek linii Vero, działając w stężeniach nietoksycznych dla komórek. Mechanizm działania galaktanów polegał prawdopodobnie na zakłóceniu mechanizmu rozpoznawania receptorów komórkowych przez glikoproteiny wirusa znajdujące się w osłonce lipidowej [71]. Ci sami badacze przedstawili dane, świadczące o tym, że innym źródłem naturalnych galaktanów mogą być również krasnorosty *Gracilaria corticata*, a związki z nich uzyskiwane również hamują adsorpcję wirusów HSV-1 i HSV-2 do komórek [60]. Natomiast galaktany uzyskiwane z alg

morskich *Bostrychia montagnei* są inhibitorami wczesnych etapów cyklu replikacyjnego HSV-1 *in vitro* [23]. Polisacharydy nie są jednak uzyskiwane wyłącznie z roślin morskich. Jednym ze źródeł tych związków jest krzew *Stevia rebaudiana* z rodziny *Asteraceae*, pochodzący z Brazylii i Paragwaju. Cukry otrzymane z tej rośliny hamują adsorpcję rotawirusów do komórek MA104 [88]. Natomiast glikozydy, uzyskiwane z widliczki *Selaginella uncinata* wykazywały się wysoką aktywnością przeciwwirusową w stosunku do RSV i słabszą aktywnością wobec wirusa parainfluenzy 3 [57].

3.3. Antrachinony

Dość wąskim spektrum przeciwwirusowym charakteryzują się antrachinony, pochodne antracenu, należące do grupy chinonów – związków o charakterze aromatycznych diketonów [43]. Stwierdzono, że antrachinony uzyskiwane z ekstraktów z rzewienia lekarskiego *Rheum officinale*, aloesu *Aloe barbadensis*, kruszyny pospolitej *Rhamnus frangula* oraz strączyńca wąskolistnego *Cassia angustifolia* wykazują wirusobójczy efekt w stosunku do HSV-1. Takiego działania nie obserwowano w przypadku wirusów takich jak adenowirusy czy rinowirusy. W badaniach z użyciem mikroskopii elektronowej wykazano, że antrachinony uszkadzają częściowo osłonkę lipidową HSV-1. Sugerowałoby to, że związki z tej grupy skuteczne są tylko wobec wirusów osłonkowych [87]. Wynikom tym przeczą jednak badania przeprowadzone przez badaczy australijskich, którzy stwierdzili, że chryzofanol (rys. 2), antrachinon uzyskiwany z rośliny używanej w tradycyjnej medycynie przez aborygenów, hamuje replikację poliovirusów typu 2 i 3 [77].



Rys. 2. Antrachinon – chryzofanol

3.4. Terpeny

Kolejną grupą związków chemicznych, wśród których stwierdza się aktywność przeciwwirusową, są terpeny. Terpeny to liczna grupa węglowodorów, o wzorze $(C_{10}H_{16})_x$, gdzie $x = 1; 1,5; 2; 3...$, oraz ich pochodne. Terpeny występują w olejkach eterycznych i pokrewnych substancjach pochodzenia roślinnego, a także w preparatach pochodzenia grzybowego i zwierzęcego.

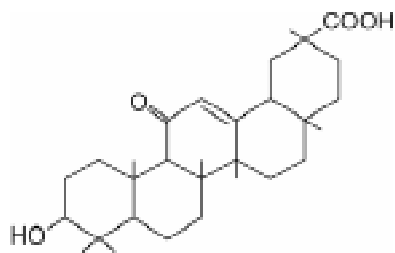
Wśród terpenów wyróżniamy: monotereny o wzorze $C_{10}H_{16}$ (alifatyczne, jednopierścieniowe i dwupierścieniowe), seskwiterpeny o wzorze $C_{15}H_{24}$ (alifatyczne, jednopierścieniowe, dwupierścieniowe i trójpierścieniowe), diterpeny ($C_{20}H_{32}$), triterpeny ($C_{30}H_{48}$), tetraterpeny ($C_{40}H_{64}$), politerpeny $(C_5H_8)_x$ oraz pochodne tych związków [43].

3.4.1. Monoterpeny. Jednym z monoterenów o udokumentowanej aktywności przeciwwirusowej jest izoborneol, izolowany z olejków eterycznych wielu roślin. Izoborneol blokował glikozylację polipeptydów wirusowych i hamował replikację wirusa opryszczki [3]. Namnażanie HSV-1, jak również VSV hamował także inny monoterepen – pochodna limonenu uzyskiwana z liści *Melia azedarach* [1]. Monoterpenami hamującymi namnażanie wirusów mogą być irydoidy – wykazano, że związek z tej grupy uzyskiwany z trędownika *Scrophularia scorodonia* hamował namnażanie HSV-1 [5].

3.4.2. Diterpeny. Także diterpeny wykazują działanie przeciwwirusowe. Po przetestowaniu dziesięciu diterpenów, uzyskiwanych z roślin należących do różnych gatunków z rodzaju wilczomlecz (*Euphorbia*), badacze węgierscy stwierdzili, że wszystkie silnie zahamowały replikację HSV-2 w komórkach linii Vero, w stężeniach nietoksycznych (z wyjątkiem jednego związku) dla komórek. Aktywność przeciwwirusowa nie była związana z działaniem wirusobójczym tych substancji [65]. Natomiast namnażanie HSV-1 hamował nowo odkryty diterpen – 7β -hydroksyfagonen, otrzymywany z *Fagonia boveana* [27]. Replikację HSV-1, a także CMV blokowały *in vitro* afidikolina – diterpen o aktywności przeciwwirusowej i antymitotycznej, oraz jej dwa analogi. Obserwowano także synergistyczny efekt działania afidikoliny i jej pochodnych w połączeniu z lekami stosowanymi powszechnie w terapii zakażeń powodowanych przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*: acyklowirem i cidofowirem. Ani afidikolina ani jej pochodne nie hamowały namnażania adenowirusów [63]. Silnymi inhibitorami namnażania HSV-1 okazały się także nowe pochodne diterpenów, uzyskiwane z rdestnicy *Potamogeton malaianus* [41], natomiast efekt hamujący replikację wirusa parainfluenzy typu 3 wykazały pochodne furanoditerpenów, uzyskiwane z nasion *Caesalpinia minax* [36].

3.4.3. Triterpeny. Związki triterpenowe także charakteryzują się właściwościami przeciwwirusowymi.

Badacze rosyjscy stwierdzili szerokie spektrum aktywności przeciwwirusowej kwasu betulinowego i jego pochodnych. Hamowały one namnażanie wirusa grypy, HSV-1 oraz enterowirusa ECHO 6. Wykazano również przeciwwirusową aktywność hydrazynu kwasu



Rys. 3. Triterpen – kwas glicyrytinowy

betulinowego wobec HIV-1 [26]. Innym triterpenem o właściwościach przeciwwirusowych jest kwas glicyrytinowy (rys. 3). Jest to aglikon glicyryzyny – kwaśnej saponiny triterpenowej występującej w korzeniu lukrecji *Glycyrrhiza glabra*. Stwierdzono wpływ kwasu glicyrytinowego na replikację wirusa Epsteina-Barr. Związek ten hamuje wczesne etapy cyklu replikacyjnego EBV, prawdopodobnie etap penetracji wirusa do komórki. Nie hamuje natomiast adsorpcji wirusa ani nie inaktywuje samych wirionów [51]. Sama glicyryzyna natomiast silnie hamowała namnażanie koronawirusa związanego z wystąpieniem SARS. Badacze niemieccy sugerują więc jej efektywne zastosowanie w terapii SARS [10].

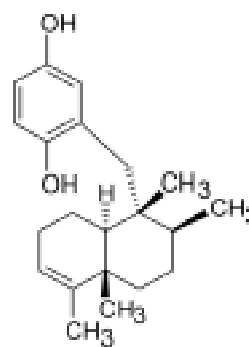
Źródłem triterpenów o działaniu przeciwwirusowym nie muszą być wyłącznie rośliny. Bioaktywne triterpeny o typie budowy lanostanu, hamujące namnażanie HSV-1, odkryto w grzybach z gatunku tęgoskór pospolity (*Scleroderma citrinum*) [37].

Zróznicowaną aktywność przeciwwirusową wykazują także związki chemiczne należące do grupy seskwiterpenów.

3.4.4. Seskwiterpeny. Seskwiterpeny to grupa związków naturalnych, obejmująca liczne węglowodory o wzorze ogólnym $(C_5H_8)_3$, a także ich pochodne: alkohole, ketony, aldehydy, kwasy oraz laktony. W sumie znanych obecnie jest ponad tysiąc związków seskwiterpenowych. Seskwiterpeny mogą mieć strukturę łańcuchową, a także jedno-, dwu-, trzy- lub czterocykliczną. Ważniejszymi podstawowymi układami strukturalnymi są: typ łańcuchowy, typ bisabolanu, typ kadinanu, humulanu, gwajanu, germakranu, eudesmanu, elemanu oraz drymanu. Do seskwiterpenów zalicza się także azuleny o budowie dwucyklicznej opartej na szkielecie gwajanu, jak również laktony seskwiterpenowe, wyprowadzone z monocyklicznego pierścienia germakranu. Seskwiterpeny są oleistymi cieczami lub substancjami stałymi. Większość z nich jest trudno lotna lub nielotna. Droga biogenezy seskwiterpenów jest dalszym etapem biosyntezy izoprenoidów. Przez połączenie trzech jednostek „aktywnego izoprenu” powstaje 15-węglowy układ farnezylopirofosforanu, z którego wywodzą się seskwiterpeny [43].

Zasięg występowania seskwiterpenów w zasadzie pokrywa się z zasięgiem występowania olejków eterycznych w poszczególnych jednostkach systematycznych świata roślinnego. Szczególnie często obecne są one u roślin nagozalążkowych – w olejkach eterycznych i żywicach, oraz w rodzinie złożonych (*Compositae*) – jako tzw. gorycze (składniki gorzkie) [43]. Seskwiterpeny wykrywane są również w grzybach [14, 84]. Laktony seskwiterpenowe rozpowszechnione są szczególnie w rodzinie *Compositae*, a azuleny i proazuleny – także w rodzinie *Compositae*, jak również w innych rodzinach, oraz w grzybach [43].

Wiele naturalnych seskwiterpenów wykazuje właściwości przeciwwirusowe. Pochodne avarolu i avaronu, związki seskwiterpenowe uzyskiwane oryginalnie z gąbek morskich z rodzaju *Dysidea*, wydają się być obiecującymi inhibitorami HIV. Związki te blokują aktywność enzymu wirusa – odwrotnej transkryptazy [31]. Również avarol (rys. 4) hamuje aktywność tego enzymu [55]. Związek ten uważany jest za potencjalną alternatywę w terapii zakażeń HIV [92], tym bardziej, że w wybranych stężeniach może działać synergistycznie z lekami stosowanymi powszechnie w terapii u chorych zakażonych HIV, takimi jak AZT [74]. Innymi seskwiterpenami, hamującymi namnażanie HIV są: seskwiterpeny o szkielecie eudesmanu, otrzymywane z *Litsea verticillata* [32], oraz eremofilany, blokujące integrację HIV-1, a więc wpływające na włączanie kwasu nukleinowego wirusa do DNA komórki [85]. Seskwiterpeny wykazują również aktywność w stosunku do wirusów z rodziny *Herpesviridae*. Półsyntetyczna pochodna artemisyny, seskwiterpenu uzyskiwanego z bylicy rocznej *Artemisia annua* [89], rośliny leczniczej używanej w tradycyjnej medycynie chińskiej, hamuje replikację ludzkiego cytomegalowirusa – zarówno szczepów wrażliwych, jak i opornych na gancyklowir [24]. Hamowanie replikacji CMV, a także aktywność wirusobójczą w stosunku do wirusów HSV-1, CMV oraz wirusów odry i grypy A wykazał seskwiterpen triptofordin C-2, izolowany z pnącza *Tripterigium wilfordii*. Co więcej, związek ten potęgował działanie acyklowiru w stosunku do HSV-1 [30]. Aktywność



Rys. 4. Seskwiterpen – avarol

wirusów HSV-1 i HSV-2 była także hamowana przez nowy związek, uzyskiwany z kory pnia *Glyptopetalum sclerocarpum* [86], natomiast namnażanie wirusa grypy A – przez hydrochinon seskwiterpenu, otrzymywany z gąbki morskiej *Strongylophora hartmani* [97]. Aktywność w stosunku do VSV wykazywały glikozydy seskwiterpenów pochodzące z nagietka *Calendula arvensis* [21] oraz seskwiterpen uzyskiwany z grzybów z gatunku pniążek pozrastany *Collybia confluens* [84]. Seskwiterpeny wyizolowane z imbiru lekarskiego *Zingiber officinale* uważane są za potencjalne źródło leków przeciwrinowirusowych [20], natomiast związki otrzymane z korzenia *Saussurea lappa* – za potencjalne źródło leków do terapii zakażeń spowodowanych wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) [9].

Ważną grupę seskwiterpenów stanowią związki chemiczne uzyskiwane z grzybów z rodzaju *Lactarius* [14]. Owocniki większości grzybów z rodzaju *Lactarius*, występujących powszechnie w Europie, mają smak gorzki i palący. Powodem tego jest występowanie w tych grzybach dużej grupy różnych aktywnych substancji chemicznych, nadających grzybom smak. Charakterystycznymi związkami dla grzybów z rodzaju *Lactarius* są seskwiterpeny, odgrywające prawdopodobnie rolę w obronie grzyba przed szkodnikami [15]. Wykazano, między innymi w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie, że seskwiterpeny (szczególnie o szkielecie laktaranu i marazmanu) znajdujące się w grzybach z rodzaju *Lactarius* mają właściwości cytotoksyczne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, a także wykazują działanie przeciwwirusowe, zmniejszając śmiertelność myszy zakażonych HSV-1 oraz łagodząc przebieg zakażenia mysim wirusem mięsaka Moloneya (*Moloney Murine Sarcoma Virus* – M-MSV) u myszy [42].

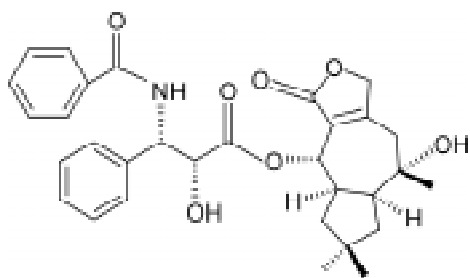
Aktywnością wirusową charakteryzowały się także *N*-benzoilofenylizoseryniany alkoholi seskwiterpenowych – pochodne naturalnych seskwiterpenów uzyskiwanych z grzybów z rodzaju *Lactarius* oraz taksolu, leku o działaniu przeciwnowotworowym [68]. Syntezy tych związków dokonano w Instytucie Chemii Orga-

nicznej PAN [47]. W doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro* *N*-benzoilofenylizoseryniany alkoholi seskwiterpenowych w sposób znaczący hamowały replikację HSV-1. Najsilniejsze działanie wykazywał 8-[*N*-benzoilo-(2'*R*, 3'*S*)-3'-fenylizoserynian] 5-deoksy-laktarolidu B (rys. 5) [49].

Różne dane na ten temat zebrano w tabeli II.

4. Metody badań aktywności przeciwwirusowej preparatów pochodzenia naturalnego

Badanie materiału roślinnego stwarza zazwyczaj duże trudności, ze względu na to, że materiał taki nie jest jednorodny. Jego obserwowane działanie lecznicze (np. przy stosowaniu w medycynie tradycyjnej) może być wypadkową aktywności wielu substancji chemicznych. Aby w ogóle badać określoną aktywność (np. przeciwwirusową) danej substancji czynnej, należy ją najpierw wyodrębnić i zidentyfikować. Podstawowa procedura prowadząca od rośliny o działaniu leczniczym do oczyszczonego, aktywnego biologicznie składnika wygląda następująco: w pierwszym etapie badany jest ekstrakt roślinny, jeśli wykazuje aktywność, jest frakcjonowany, po czym oceniana jest aktywność biologiczna wszystkich frakcji. Wreszcie uzyskiwane są czyste substancje chemiczne, badana jest ich struktura, jak również oddziaływanie biologiczne [29, 33]. Procedura ta jest dość długotrwała i kosztowna, dlatego też stosowane są także jej modyfikacje, np. badany jest skład chemiczny danego ekstraktu, co pozwala na uniknięcie izolowania już znanych substancji [33]. W ciągu ostatnich 50 lat nastąpił ogromny rozwój metod uzyskiwania aktywnych związków pochodzenia naturalnego. W celu wykrycia takich związków stosuje się czułe i specyficzne metody chromatograficzne, jak chromatografia cienkowarstwowa (TLC), chromatografia gazowo-cieczowa (GLC) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Aby określić strukturę chemiczną substancji aktywnych stosowane są m.in.: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz dwuwymiarowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (2D-NMR). W celu zwiększenia czułości i specyficzności tych metod, od lat osiemdziesiątych XX w. coraz częściej używane są metody sprzężone, jak np. spektrometria masowa w sprzężeniu z chromatografią gazową (GC-MS) [70]. Ze względu na to, że metody te, zwłaszcza metody sprzężone pozwalają na uzyskanie ogromnych ilości informacji, niezbędny jest kolejny krok: stworzenie internetowych baz danych, zawierających informacje o strukturze chemicznej i aktywności biologicznej danej substancji, które pozwalałyby na szybkie porównanie uzyskiwanych związków z substancjami „referencyjnymi” [33].



Rys. 5. Pochodna naturalnego seskwiterpenu uzyskanego z grzybów z rodzaju *Lactarius* oraz taksolu – 8-[*N*-benzoilo-(2'*R*, 3'*S*)-3'-fenylizoserynian] 5-deoksy-laktarolidu B

Tabela II

Aktywność przeciwwirusowa związków chemicznych pochodzenia naturalnego

Grupy związków chemicznych	Badane związki chemiczne	Rośliny (preparaty roślinne), z których otrzymywano badane związki	Wirusy, w stosunku do których związki były aktywne	Sposób działania	Písmienictwo
Flawonoidy	chryzospelenol C	<i>Pteurocaulon sphacelatum</i>	pikornawirusy	hamowanie namnażania wirusów	[76]
	3-metylokwercecytyna	<i>Euphorbia grantii</i>	pikornawirusy	hamowanie syntezy białek i RNA	[94]
	kwercecytyna, hesperetyna	<i>Crateagus</i> spp., owoce cytrusowe	poliowirus typu 1, wirus parainfluenzy typu 3, RSV, HSV-1	hamowanie namnażania	[38, 96]
	kwercecytyna, hesperydyna	<i>Crateagus</i> spp., owoce cytrusowe	EMC	zmniejszenie śmiertelności zakażonych myszy	[68]
	resweratrol	winogrona	HSV-1, HSV-2	hamowanie wstępnych etapów replikacji, hamowanie reaktywacji latentnych wirusów	[23]
	amentoflawon, robustaflawon	<i>Rhus succedanea</i> , <i>Garcinia multiflora</i>	wirusy grypy A i B, HSV-1, HSV-2	hamowanie namnażania	[53]
	robustaflawon	<i>Rhus succedanea</i> , <i>Garcinia multiflora</i>	HIV-1	blokowanie aktywności odwrotnej transkryptazy	[53]
	lignany	<i>Larrea divaricata</i>	HPV-16	hamowanie ekspresji genów	[12]
Polisacharydy	galaktany	<i>Cryptopleura ramosa</i> , <i>Gracilaria corticata</i>	HSV-1, HSV-2	hamowanie adsorpcji	[6, 61]
	galaktany	<i>Gymnogongrus torulosus</i>	HSV-2, wirus dengi	hamowanie adsorpcji	[71]
	galaktany	<i>Bostrychia montagnei</i>	HSV-1	hamowanie adsorpcji	[24]
	polisacharydy	<i>Stevia rebaudiana</i>	rotawirusy	hamowanie adsorpcji	[88]
	glikozydy	<i>Selaginella uncinata</i>	RSV, wirus parainfluenzy typu 3	hamowanie namnażania	[58]
Antrachinony	antrachinony	<i>Rheum officinale</i> , <i>Aloe barbadensis</i> , <i>Rhamnus frangula</i> , <i>Cassia angustifolia</i>	HSV-1	działanie wirusobójcze, uszkodzanie osłonki lipidowej	[87]
	chryzofanol	<i>Dianella longifolia</i>	poliowirusy typu 2 i 3	hamowanie namnażania	[77]
Monoterpeny	izoborneol	olejki eteryczne wielu roślin	HSV-1	blokowanie glikozylacji polipeptydów	[3]
	pochodna limonenu	<i>Melia azedarach</i>	HSV-1, VSV	hamowanie namnażania	[1]
	irydoidy	<i>Scrophularia scorodonia</i>	HSV-1	hamowanie namnażania	[5]

c.d. tab. II

Grupy związków chemicznych	Badane związki chemiczne	Rośliny (preparaty roślinne), z których otrzymywano badane związki	Wirusy, w stosunku do których związki były aktywne	Sposób działania	Piśmiennictwo
Diterpeny	diterpeny	różne gatunki <i>Euphorbia</i>	HSV-2	hamowanie namnażania	[66]
	7β-hydroksyfagonen	<i>Fagonia boveana</i>	HSV-1	hamowanie namnażania	[29]
	afidikolina	<i>Cephalosporium amphidicola</i> (grzyb)	HSV-1, CMV	hamowanie namnażania	[64]
	diterpeny	<i>Potamogeton malaianus</i>	HSV-1	hamowanie namnażania	[42]
	pochodne furanoditerpenów	<i>Caesalpinia minax</i>	wirus parainfluenzy typu 3	hamowanie namnażania	[36]
Triterpeny	kwas betuliny i jego pochodne	<i>Betula alba</i>	wirus grypy, HSV-1, enterowirus ECHO 6, HIV-1	hamowanie namnażania	[27]
	glicyryzyna	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	koronawirus związany z SARS	hamowanie namnażania	[10]
	kwas glicyrytinowy (pochodna glicyryzyny)	–	EBV	hamowanie penetracji wirusa do komórki	[52]
	pochodne lanostanu	<i>Scleroderma citrinum</i> (grzyb)	HSV-1	hamowanie namnażania	[37]
Seskwiterpeny	avarol i jego pochodne	gąbki z rodzaju <i>Dysidea</i>	HIV	blokowanie aktywności odwrotnej transkryptazy	[32, 56]
	pochodne eudesmanu	<i>Litsea vercillata</i>	HIV	hamowanie namnażania	[33]
	eremofilany	<i>Petasites japonicus</i>	HIV-1	blokowanie integrazy wirusa	[85]
	pochodna artemisyny	<i>Artemisia annua</i>	CMV	hamowanie namnażania	[25]
	triptofordin C-2	<i>Tripterigium wilfordii</i>	CMV, HSV-1, wirus odry, wirus grypy A	działanie wirusobójcze	[31]
	seskwiterpen	<i>Glyptopetalum sclerocarpum</i>	HSV-1, HSV-2	hamowanie namnażania	[86]
	hydrochinon seskwiterpeny	<i>Strongylophora hartmani</i>	wirus grypy A	hamowanie namnażania	[97]
	pochodne różnych seskwiterpenów	<i>Calendula arvensis</i> , <i>Collybia confluens</i> (grzyb)	VSV	hamowanie namnażania, hamowanie syntezy DNA, RNA i białek	[22, 84]
	seskwiterpeny	<i>Zingiber officinale</i>	rinowirusy	hamowanie namnażania	[21]
	seskwiterpeny	<i>Saussurea lappa</i>	HBV	hamowanie ekspresji genów	[9]
	różne seskwiterpeny i ich pochodne	<i>Lactarius</i> spp. (grzyb)	HSV-1, M-MSV	hamowanie namnażania, zmniejszenie śmiertelności zakażonych myszy, złagodzenie przebiegu zakażenia u myszy	[43, 50]

W celu stwierdzenia aktywności przeciwwirusowej nowych preparatów i substancji pochodzenia naturalnego należy określić ich wpływ na namnażanie różnych wirusów (zalecane jest stosowanie różnych modeli doświadczalnych wirusów DNA i RNA) przy jednoczesnej ocenie cytotoksyczności tych preparatów. Ponieważ badania takie są często testami przesiewowymi, kiedy ocenia się znaczną liczbę nowych substancji i preparatów, do oceny aktywności przeciwwirusowej używane są najczęściej metody najprostsze i najtańsze, jak metoda redukcji miana wirusowego czy metoda redukcji łysinek [np. 21–23, 28, 36, 49, 50, 84, 86, 88, 97]. Dopiero, gdy liczba badanych związków jest ograniczona, stosowane są metody o większej czułości, np. kolorymetryczne czy immunoenzymatyczne. Kolejnym etapem badań jest wykluczenie aktywności mutagennej badanych związków, wreszcie ocena ich aktywności *in vivo*, przy użyciu różnych modeli doświadczalnych zakażeń zwierząt laboratoryjnych.

5. Podsumowanie

Jeszcze do niedawna, w dwudziestym wieku sądzono, że ludzkość pokonała choroby zakaźne. W wieku dwudziestym pierwszym wiadomo już, że takie stwierdzenia były zbyt optymistyczne. Ludzkość nie tylko, że nie dała sobie rady z licznymi chorobami zakaźnymi, ale zaczynają ją nękać nowe choroby, dotąd nieznanne albo uważane dotychczas za niegroźne. Dotyczy to zresztą nie tylko chorób zakaźnych ale i innych, na przykład tzw. chorób cywilizacyjnych, jak choroby płuc, serca, czy choroby psychiczne. Jest więc kwestią palącą poszukiwanie nowych terapeutyków. Nowe leki są niezbędne w terapii chorób spowodowanych przez bakterie, które stały się odporne na stosowane dotąd preparaty. Zjawisko oporności obserwowane jest również w przypadku wirusów, a odrębną kwestią stanowi fakt, że leków przeciwwirusowych jest niewiele, mają one zazwyczaj wąskie spektrum aktywności, a ich stosowanie obciążone jest licznymi efektami ubocznymi.

Doskonałym potencjalnym źródłem nowych leków są surowce naturalne. Jest to źródło ogromne i praktycznie niewyczerpane, biorąc pod uwagę fakt, że po stwierdzeniu aktywności terapeutycznej danego preparatu np. roślinnego dąży się do opracowania jego syntezy na drodze chemicznej. Ma to więc znaczenie zarówno ekonomiczne, jak i ekologiczne.

Poszukiwania nowych terapeutyków wśród produktów naturalnych, głównie roślinnych, rzadziej zwierzęcych oraz pochodzenia grzybowego, prowadzone są na całym świecie od wielu lat. Owocem tych badań jest stwierdzenie, że wiele grup związków chemicznych pochodzenia naturalnego wykazuje aktywność przeciwwirusową. Związkami tymi są, między innymi: fla-

wonoidy, polisacharydy, antrachinony i terpeny (mono-, di-, tri- oraz seskwiterpeny). Oddziaływaniem przeciwwirusowym, niejednokrotnie silniejszym, niż substancje „wyjściowe”, mogą charakteryzować się również pochodne tych związków, otrzymane na drodze syntezy chemicznej. Przykładem mogą być N-benzoilofenyloizoseryniany alkoholi seskwiterpenowych. Związki chemiczne pochodzenia naturalnego oraz ich pochodne wykazują różnorodną aktywność przeciwwirusową, działając w stosunku do wielu różnych wirusów (DNA i RNA, osłonkowych i bezosłonkowych). Substancje te charakteryzują się różnymi mechanizmami działania, blokując cykl replikacyjny wirusów na różnych etapach.

Wydaje się więc, że dalsze badania nad związkami pochodzenia naturalnego, jak również ich pochodnymi, są zasadne, ponieważ mogą one stanowić potencjalne źródło chemioterapeutyków przeciwwirusowych.

Piśmiennictwo

1. Alche L.E., Ferek G.A., Meo M., Coto C.E., Maier M.S.: An antiviral meliacarbin from leaves of *Melia azedarach* L. *Z. Naturforsch. [C]*, **58**, 215–219 (2003)
2. Amoros M., Simões C.M.O., Girre L., Sauvager F., Cormier M.: Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral of propolis. *J. Nat. Prod.* **55**, 1732–1740 (1992)
3. Armaka M., Papanikolaou E., Sivropoulou A., Arsenakis M.: Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* **43**, 79–92 (1999)
4. Berge J.P., Bourgougnon N., Alban S., Pojer F., Billaudel S., Chermann J.C., Robert J.M., Franz G.: Antiviral and anti-coagulant activities of a water-soluble fraction of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Planta Med.* **65**, 604–609 (1999)
5. Bermejo P., Abad M.J., Diaz A.M., Fernandez L., Santos J.D., Sanchez S., Villaescusa L., Carrasco L., Irurzun A.: Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. *Planta Med.* **68**, 106–110 (2002)
6. Carlucci M.J., Scolaro L.A., Errea M.I., Matulewicz M.C., Damonte E.B.: Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. *Planta Med.* **63**, 429–432 (1997)
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): West Nile virus activity-United States, November 6–12, 2003. *M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **14**, 1105–1106 (2003)
8. Chantrill B.H., Coulthard C.E., Dickinson L., Inkley G.W., Morris W., Pyle A.H.: The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. *J. Gen. Microbiol.* **6**, 74–84 (1952)
9. Chen H.C., Chou C.K., Lee S.D., Wang J.C., Yeh S.F.: Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* **27**, 99–109 (1995)
10. Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Chandra P., Rabenau H., Doerr H.W.: Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*, **361**, 2045–2046 (2003)

11. Cordell G.A.: Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, **40**, 1585–1612 (1995)
12. Craig J., Callahan M., Huang R.C., DeLucia A.L.: Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* **47**, 19–28 (2000)
13. Czerny B.: Uwagi na temat ubocznych efektów stosowania roślinnych środków leczniczych. *Post. Fitoter.* **3**, 21–23 (2000)
14. Daniewski W.M., Vidari G.: Constituents of *Lactarius* (Mushrooms) (w:) Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, red. Herz W., Falk H., Kirby G.W., Moore R.E., Tamm C., Springer-Verlag Wien New York, 1999, s. 70–171
15. Daniewski W.M., Gumułka M., Przesmycka D., Ptaszyńska K., Błoszyk E., Drożdż B.: Sesquiterpenes of *Lactarius* origin, antifeedant structure-activity relationships. *Phytochemistry*, **38**, 1161–1168 (1995)
16. De Clercq E.: 2001 ASPET Otto Krayer Award Lecture. Molecular targets for antiviral agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 1–10 (2001)
17. De Clercq E.: Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 13–25 (2002)
18. De Clercq E.: Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2**, 163–175 (2002)
19. De Clercq E.: Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 569–596 (2003)
20. Denyer C.V., Jackson P., Loakes D.M., Ellis M.R., Young D.A.: Isolation of antirhinoviral sesquiterpenes from ginger (*Zingiber officinale*). *J. Nat. Prod.* **57**, 658–662 (1994)
21. De Tommasi N., Pizzi C.: Structure and *in vitro* antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* **53**, 830–835 (1990)
22. Docherty J.J., Fu M.M., Stiffler B.S., Limperos R.J., Pokabla C.M., DeLucia A.L.: Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* **43**, 145–155 (1999)
23. Duarte M.E., Nosedá D.G., Nosedá M.D., Tulio S., Pujol C.A., Damonte E.B.: Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. *Phytomedicine*, **8**, 53–58 (2001)
24. Efferth T., Marschall M., Wang X., Huang S.M., Hauber I., Olbrich A., Kronschnabl M., Stamminger T., Huang E.S.: Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J. Mol. Med.* **80**, 233–242 (2002)
25. Fan J., Ma W.H., Qian J., Chen Z., Huang D.S., Wang W.L., Zheng S.S.: Cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **1**, 30–32 (2002)
26. Flekhter O.B., Boreko E.I., Nigmatullina L.R., Pavlova N.I., Nikolaeva S.N., Savinova O.V., Eremin V.F., Baltina L.A., Galin F.Z., Tolstikov G.A.: Synthesis and antiviral activity of hydrazides and substituted benzalhydrazides of betulonic acid and its derivatives (artykuł w języku rosyjskim). *Bioorg. Khim.* **29**, 326–332 (2003)
27. Gedara S.R., Abdel-Halim O.B., el-Sharkawy S.H., Salama O.M., Shier T.W., Halim A.F.: New erythropane-type diterpenoids from *Fagonia boveana* (Hadidi) Hadidi & Graf. *Z. Naturforsch. [C]*, **58**, 23–32 (2003)
28. Glatthaar-Saalmüller B., Sacher F., Esperester A.: Antiviral activity of an extract derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Antiviral Res.* **50**, 223–228 (2001)
29. Hamburger M.: Tracking bioactivity in plant extracts – new concepts and approaches (w:) Society for Medicinal Plant Research 50 Years 1953–2003 A Jubilee Edition, red. Sprecher E., Caesar W., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2003, s. 109–122
30. Hayashi K., Hayashi T., Ujita K., Takaishi Y.: Characterization of antiviral activity of a sesquiterpene, triptofordin C-2. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 759–768 (1996)
31. Hirsch S., Rudi A., Kashman T.: New avarone and avarol derivatives from the marine sponge *Dysidea cinerea*. *J. Nat. Prod.* **54**, 92–97 (1991)
32. Hoang V.D., Tan G.T., Zhang H.J., Tamez P.A., Hung N.V., Cuong N.M., Soejarto D.D., Fong H.H., Pezzuto J.M.: Natural anti-HIV agents-part I: (+)-demethoxyepiexcelsin and verticillatol from *Litsea verticillata*. *Phytochemistry*, **59**, 325–329 (2002)
33. Hostettmann K., Wolfender J., Marston A.: Hyphenated HPLC techniques for screening and quality control (w:) Society for Medicinal Plant Research 50 Years 1953–2003 A Jubilee Edition, red. Sprecher E., Caesar W., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2003, s. 99–108
34. Jambor J., Czosnowska E.: Preparaty ze świeżych roślin. *Post. Fitoter.* **8** (1–2), 2–5 (2002)
35. Jassim S.A., Naji M.A.: Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 412–427 (2003)
36. Jiang R.W., Ma S.C., But P.P., Mak T.C.: New antiviral casane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*. *J. Nat. Prod.* **64**, 1266–1272 (2001)
37. Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Prajuabsuk T., Soyong K., Kongsaree P., Suksamrarn A.: A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum*. *Planta Med.* **69**, 568–571 (2003)
38. Kaul T.N., Middleton Jr E., Ogra P.L.: Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* **15**, 71–79 (1985)
39. Kędzia B., Alkiewicz J., Han S.: Znaczenie olejku z drzewa herbacianego w fitoterapii. Cz. I. Skład olejku i jego właściwości biologiczne. *Post. Fitoter.* **2**, 36–40 (2000)
40. Kimberlin D.W., Whitley R.J.: Antiviral resistance – an emerging problem. *Antiviral Res.* **26**, 365–368 (1995)
41. Kittakoop P., Wanasith S., Watts P., Kramyu J., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y.: Potent antiviral potamogetonyde and potamogetonol, new furanoid labdane diterpenes from *Potamogeton malaianus*. *J. Nat. Prod.* **64**, 385–388 (2001)
42. Kobus M., Przybylski M., Daniewski W., Krawczyk E., Łuczak M.: Właściwości biologiczne seskwiterpenów pochodzących z grzybów z rodzaju *Lactarius*. *Probl. Hig.* **71**, 134–139 (2001)
43. Köhlkünzer S.: Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa 1985
44. Konowalchuk J., Speirs J.I.: Virus inactivation by grapes and wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 757–763 (1976)
45. Konowalchuk J., Speirs J.I.: Antiviral effect of commercial juices and beverages. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 1219–1220 (1978)
46. Konowalchuk J., Speirs J.I.: Antiviral effect of apple beverages. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 798–801 (1978)
47. Kopezański P., Gumułka M., Masnyk M., Grabarczyk H., Nowak G., Daniewski W.M.: Synthesis and antifeedant properties of *N*-benzoylphenylisoserinates of *Lactarius* sesquiterpenoid alcohols. *Phytochemistry*, **58**, 775–787 (2001)
48. Kott V., Barbini L., Cruanes M., Muñoz J.D., Vivot E., Cruanes J., Martino V., Ferraro G., Cavallaro L., Campos R.: Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 79–84 (1999)
49. Krawczyk E., Łuczak M., Kobus M., Bańka D., Daniewski W.: Antiviral activity of *N*-benzoylphenylisoserinates of *Lacta-*

- rius* sesquiterpenoid alcohols *in vitro*. *Planta Med.* **69**, 552–554 (2003)
50. Kuo Y.C., Chen C.C., Tsai W.J., Ho Y.H.: Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Res.* **51**, 95–109 (2001)
51. Lin J.C.: Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **59**, 41–47 (2003)
52. Lin Y.M., Anderson H., Flavin M.T., Pai Y.H., Mata-Greenwood E., Pengsuparp T., Pezzuto J.M., Schinazi R.F., Hughes S.H., Chen F.C.: *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J. Nat. Prod.* **60**, 884–888 (1997)
53. Lin Y.M., Flavin M.T., Schure R., Chen F.C., Sidwell R., Barnard D.L., Huffman J.H., Kern E.R.: Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med.* **65**, 120–125 (1999)
54. Locher C.P., Burch M.T., Mower H.F., Berestecky J., Davis H., Van Poel B., Lasure A., Vanden Berghe D.A., Vlietinck A.J.: Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 23–32 (1995)
55. Loya S., Hizi A.: The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by avarol and avarone derivatives. *FEBS Lett.* **269**, 131–134 (1990)
56. Lutomski J., Mścisz A.: Znaczenie prewencyjne związków polifenolowych zawartych w winogronach. *Post. Fitoter.* **10**: 6–10 (2003)
57. Ma L.Y., Ma S.C., Wei F., Lin R.C., But P.P., Lee S.H., Lee S.F.: Uncinoside A and B, two new antiviral chromone glycosides from *Selaginella uncinata*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **51**, 1264–1267 (2003)
58. Matsuo R., Ball M.A., Kobayashi M., Herndon D.N., Pollard R.B., Suzuki F.: Effects of a traditional Chinese herbal medicine, Kanzo-bushi-to, on the resistance of thermally injured mice infected with herpes simplex virus type 1. *Int. J. Immunopharmacol.* **16**, 855–863 (1994)
59. Mayer A.M., Hamann M.T.: Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **132**, 315–339 (2002)
60. Mazumder S., Ghosal P.K., Pujol C.A., Carlucci M.J., Damonte E.B., Ray B.: Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* **31**, 87–95 (2002)
61. McCutcheon A.R., Roberts T.E., Gibbons E., Ellis S.M., Babiuk L.A., Hancock R.E., Towers G.H.: Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 101–110 (1995)
62. el-Mekkawy S., Meselhy M.R., Kusumoto I.T., Kadota S., Hattori M., Namba T.: Inhibitory effects of Egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **43**, 641–648 (1995)
63. Michaelis M., Langer K., Vogel J.U., Kreuter J., Rabenau H., Doerr H.W., Cinatl J.: *In vitro* antiviral activity of aphidicolin and its derivatives. Synergistic effects of aphidicolin with other antiviral drugs. *Arzneimittelforschung*, **52**, 393–399 (2002)
64. Mitrocotsa D., Mitaku S., Axarlis S., Harvala C., Malamas M.: Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus. *Planta Med.* **66**, 377–379 (2000)
65. Mucsi I., Molnar J., Hohmann J., Redei D.: Cytotoxicities and anti-herpes simplex virus activities of diterpenes isolated from *Euphorbia* species. *Planta Med.* **67**, 672–674 (2001)
66. Nagasaka K., Kurokawa M., Imakita M., Terasawa K., Shiraki K.: Efficacy of Kakkon-to, a traditional herb medicine, in herpes simplex virus type 1 infection in mice. *J. Med. Virol.* **46**, 28–34 (1995)
67. Panasiak W., Wleklík M., Oraczewska A., Łuczak M.: Influence of flavonoids on combined experimental infections with EMC virus and *Staphylococcus aureus* in mice. *Acta Microbiol. Polon.* **38**, 185–188 (1989)
68. Panchagnula R.: Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *Int. J. Pharm.* **172**, 1–15 (1998)
69. Phillipson J.D.: Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, **56**, 237–243 (2001)
70. Phillipson J.D.: 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. *Planta Med.* **69**, 491–495 (2003)
71. Pujol C.A., Estevez J.M., Carlucci M.J., Ciancia M., Cerezo A.S., Damonte E.B.: Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antivir. Chem. Chemother.* **13**, 83–89 (2002)
72. Sanchez Palomino S., Abad M.J., Bedoya L.M., Garcia J., Gonzales E., Chiriboga X., Bermejo P., Alcamí J.: Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1147–1150 (2002)
73. Schaeffer D.J., Krylov V.S.: Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **45**, 208–227 (2000)
74. Schroder H.C., Sarin P.S., Rottmann M., Wenger R., Maidhof A., Renneisen K., Muller W.E.: Differential modulation of host cell and HIV gene expression by combinations of avarol and AZT *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3947–3952 (1988)
75. Semple S.J., Reynolds G.D., O’Leary M.C., Flower R.L.: Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.* **60**, 163–172 (1998)
76. Semple S.J., Nobbs S.F., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L.: Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. *J. Ethnopharmacol.* **68**, 283–288 (1999)
77. Semple S.J., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L.: *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Res.* **49**, 169–178 (2001)
78. Serkedjieva J.: Antiinfective activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Pharmazie*, **52**, 799–802 (1997)
79. Serkedjieva J.: Antiherpes virus effect of the red marine alga *Polysiphonia denudata*. *Z. Naturforsch. [C]*, **55**, 830–835 (2000)
80. Serkedjieva J., Ivancheva S.: Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 59–68 (1999)
81. Serkedjieva J., Konaklieva M., Dimitrova-Konaklieva S., Ivanova V., Stefanov K., Popov S.: Antiinfluenza virus effect of extracts from marine algae and invertebrates. *Z. Naturforsch. [C]*, **55**, 87–93 (2000)
82. Sia I.G., Patel R.: New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 83–121 (2000)

83. Simões C.M.O., Falkenberg M., Auler Mentz L., Schenkel E.P., Amoros M.: Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, **6**, 205–214 (1999)
84. Simon B., Anke T., Anders U., Neuhaus M., Hansske F.: Collybial, a new antibiotic sesquiterpenoid from *Collybia confluens* (Basidiomycetes). *Z. Naturforsch. [C]*, **50**, 173–180 (1995)
85. Singh S.B., Felock P., Hazuda D.J.: Chemical and enzymatic modifications of integrin acid and HIV-1 integrase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 235–238 (2000)
86. Sotanaphun U., Lipipun V., Suttisri R., Bavovada R.: A new antiviral and antimicrobial sesquiterpene from *Glyptopetalum sclerocarpum*. *Planta Med.* **65**, 257–258 (1999)
87. Sydskis R.J., Owen D.G., Lohr J.L., Rosler K.H., Blomster R.N.: Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 2463–2466 (1991)
88. Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., Shigeta S.: Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* **49**, 15–24 (2001)
89. Tan R.X., Zheng W.F., Tang H.Q.: Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.* **64**, 295–302 (1998)
90. Taylor R.S., Manandhar N.P., Hudson J.B., Towers G.H.: Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **52**, 157–163 (1996)
91. Tyler V.E.: *Phytomedicines: Past, Present, and Future – from an American Point of View* (w:) Society for Medicinal Plant Research 50 Years 1953–2003 A Jubilee Edition, red. Sprecher E., Caesar W., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2003, s. 85–92
92. Tziveleka L.A., Vagias C., Roussis V.: Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 1512–1535 (2003)
93. UNAIDS.: AIDS epidemic update 2003, Genewa, 2003
94. Vrijssen R., Everaert L., Van Hoof L.M., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D.A., Boeye A.: The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Res.* **7**, 35–42 (1987)
95. WHO Website 21 kwietnia 2004 roku (online): Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003, http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/ (12 sierpnia 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia).
96. Wleklík M., Łuczak M., Panasiak W., Kobus M., Lammer-Zarawska E.: Structural basis for antiviral activity of flavonoids – naturally occurring compounds. *Acta Virol.* **32**, 522–525 (1988)
97. Wright A.E., Rueth S.A., Cross S.S.: An antiviral sesquiterpene hydroquinone from the marine sponge *Strongylophora hartmani*. *J. Nat. Prod.* **54**, 1108–1111 (1991)
98. Yamasaki K., Otake T., Mori H., Morimoto M., Ueba N., Kurokawa Y., Shiota K., Yuge T.: Screening test of crude drug extract on anti-HIV activity (artykuł w języku japońskim). *Yakugaku Zasshi*, **113**, 818–824 (1993)
99. Yip L., Pei S., Hudson J.B., Towers G.H.: Screening of medicinal plants from Yunnan Province in southwest China for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.* **34**, 1–6 (1991)
100. Zgorniak-Nowosielska I., Grzybek J., Manolova N., Serkedjieva J., Zawilinska B.: Antiviral activity of Flos verbasci infusion against influenza and Herpes simplex viruses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **39**, 103–108 (1991)

Praca została sfinansowana z funduszy Komitetu Badań Naukowych (Projekt nr 3 P05A 097 23) oraz tematu własnego Akademii Medycznej (1M20/W1/2004)

Elżbieta Lonc, Sylwia Andrzejczak

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Parazytologii,
ul. Przybyszewskiego 63/67, 51-148 Wrocław

Wpłynęło w kwietniu 2005 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka toksyn *Bacillus thuringiensis*. 3. Docelowe organizmy i ich receptory. 4. Poszukiwania nowych toksyn *Bacillus thuringiensis*. 5. Rozwój oporności na delta-endotoksyny. 6. Genetyka *Bacillus thuringiensis*. 7. Ekologia *Bacillus thuringiensis*. 8. Bezpieczeństwo *Bacillus thuringiensis* dla człowieka. 9. Podsumowanie

Biodiversity of toxins of *Bacillus thuringiensis* and their application

Abstract: Crystal toxin proteins from *Bacillus thuringiensis* are used extensively to control insect pest. The success of these toxins is caused in large part by their high toxicity toward insects but no toxicity toward other animals. During the past 5 years *B. thuringiensis* has been subject of intensive research. These efforts have yielded considerable data about the complex relationship between the structure, mechanism of action, and genetics of the organism's pesticidal crystal proteins. Other studies have focused on the ecological role of the *B. thuringiensis* toxins, their performance in agriculture and other natural settings. Now, with the tools of modern biotechnology, researchers can construct more useful toxins and formulation. Cognition of environmental conditions of growth of *B. thuringiensis* strains is important because of practical and technological application. Easy technique of isolation these bacteria reduce high costs of production of bioinsecticides.

1. Introduction. 2. Characteristic of *Bacillus thuringiensis* toxins. 3. Target organisms and their receptors. 4. New endotoxins research. 5. Development of resistance to endotoxins. 6. Genetics of *Bacillus thuringiensis*. 7. Ecology of *Bacillus thuringiensis*. 8. *Bacillus thuringiensis* safety. 9. Summary

Słowa kluczowe: biopreparaty, delta-endotoksyny, owadobójczość

Keywords: biopreparates, delta-endotoxins, insecticide

1. Wprowadzenie

Bacillus thuringiensis, powszechnie znany jako „Bt”, został odkryty w larwach jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) w Japonii w 1901 roku przez Ishawata [45]. Gatunek natomiast ustanowił w roku 1911 Ernest Berliner, który jako pierwszy użył nazwy „thuringiensis” opisując laseczki izolowane w Turyngii z larw młnika mącznego (*Ephesia kühniella*). Opisanie bakterii oraz ich owadobójczych właściwości dało początek intensywnym badaniom, szczególnie nasilonym w latach 90. XX wieku. Ich efektem, po prawie 100 latach, jest kolekcja około 3500 izolatów *B. thuringiensis* pochodzących z 22 krajów [48], powszechne stosowanie preparatów zawierających delta-endotoksyny w biologicznej kontroli owadów oraz transgeniczne rośliny zawierające geny endotoksyn [82]. W Instytucie Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego zgromadzono kilkadziesiąt krajowych szczepów *B. thuringiensis* [13], wśród których znajduje się *B. thuringiensis wratislaviensis* H-47, izolowany z gleby ogrodowej przez Lonc i wsp. [54]. Mikrobiologiczne insektycydy, jako przyjazne środowisku przyrodniczemu, są ważnym elementem integrowanych metod ochrony przed szkodnikami

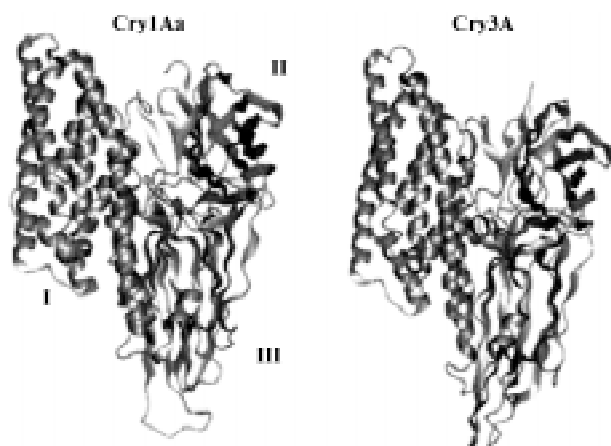
drzew i roślin uprawnych [53, 59] oraz pasożytami będącymi problemem hodowlanym i sanitarnym w produkcji zwierzęcej [57]. Biopreparaty stosuje się także w ochronie zdrowia człowieka przed uciążliwymi komarami i meszkami (wektorami groźnych chorób) w ekosystemach miejskich, np. we Wrocławiu [52, 76].

Turyńska laseczka jest przedmiotem licznych badań, nie tylko mikrobiologów czy parazytologów, ale także biochemików, wirusologów, immunologów i innych. Dowodem są setki szczegółowych prac z zakresu *B. thuringiensis*, a także obszernie interdyscyplinarne opracowania książkowe [15, 23] i artykuły syntetyzujące wiedzę wnoszoną przez różnych specjalistów [10, 46, 82].

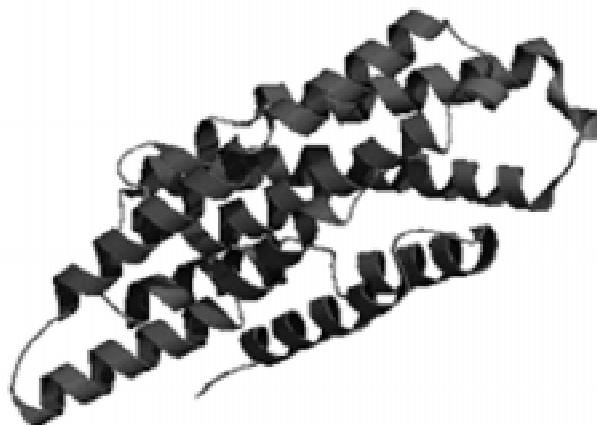
Celem niniejszej pracy jest ukazanie ostatnich, kilkuletnich trendów badawczych, w których modelowe badania laseczki *B. thuringiensis* wzbogaciły wiedzę z zakresu biologii i ekologii drobnoustrojów oraz ukazały nowe możliwości jej praktycznej aplikacji.

2. Charakterystyka toksyn *Bacillus thuringiensis*

Powszechnie wiadomo, że entomopatogenne właściwości *Bacillus thuringiensis* są warunkowane przede wszystkim przez parasporalne inkluzje wytwarzane



Rys. 1. Trójdomenowa (I, II, III) struktura delta-endotoksyn, na przykładzie białek Cry1Aa i Cry3A



Rys. 2. 7 alfa-helis domeny I delta-endotoksyny.

podczas sporulacji. Kryształy te zbudowane są z białek znanych jako białka Cry (crystal proteins) lub delta-endotoksyny [10], mających charakterystyczną trójdomenową budowę (Rys. 1.). Szczegółowe badania nad licznymi szczepami *B. thuringiensis* dokumentują dużo większą, niż sądzono różnorodność krystalicznych białek, zarówno pod względem budowy, jak i toksyczności w stosunku do owadów. Obecnie stosowana klasyfikacja białek Cry i Cyt, zaproponowana przez Crickmore'a i wsp. w 1998 roku [10], oparta na kryterium sekwencji aminokwasów, porządkuje tę bioróżnorodność białek pakowanych w parasporalne inkluzje. Sedlak i wsp. [83] ustalili, iż wieloetapowy proces pakowania toksyn w inkluzje może być zależny od pewnego mechanizmu kontrolującego poziom syntezy protoksyn. W kontroli tej udział mogą brać nakładające się promotory BtI i BtII. Chang i wsp. [8] sugerują natomiast, iż interakcje delta-endotoksyn wpływające na formowanie regularnych kryształów wymagają innych czynników. Przykładem takiego czynnika może być białko pomocnicze P20, którego obecność u *B. th. israelensis* wykazali Shao i wsp. [84]. Białko P20 zapewnia u tych bakterii efektywną produkcję toksyn Cry11A i CytA. Ponadto szczepy posiadające ten czynnik formują znacznie większe kryształy w stosunku do szczepów nie posiadających białka P20. Xu i wsp. [99] potwierdzili efektywność czynnika P20. Bakterie produkujące, oprócz toksyn Cry11A, także białko P20 są bardziej toksyczne w stosunku do larw komarów egipskich *Aedes aegypti* w porównaniu z bakteriami wytwarzającymi tylko endotoksyny. Do powstawania kryształów białka CryIIA wymagane jest natomiast prawdopodobnie białko kodowane przez gen *orf2*. Staples i wsp. [86] zaobserwowali, że w komórkach, w których brak jest czynnika Orf, występuje zaburzenie formowania kryształów. Czynniki te zatem prawdopodobnie służą jako „spoiwo” przy formowaniu regularnych kryształów.

Toksyczność całego kryształu może przewyższać sumę toksyczności poszczególnych składowych, co świadczy o synergistycznym działaniu białek [82].

W najnowszych badaniach, u progu XXI wieku, analizowane są różne aspekty molekularnej budowy endotoksyn w powiązaniu z ich toksycznością wobec organizmów będących przedmiotem zwalczania. Aktywacja protoksyny, poprzez proteolityczne cięcie cząsteczki, rozpoczyna się od usunięcia fragmentu C-końcowego oraz od 30 do 60 reszt aminokwasowych na N-końcu [82]. Bravo i wsp. [5] potwierdzili, iż aktywacja toksyny Cry1Ac jest zasadniczym krokiem w mechanizmie działania tego białka. Stworzone przez nich, częściowo aktywne, mutanty wykazywały wielokrotnie niższą toksyczność, niż w pełni aktywne białka. Obecność N-końcowego peptydu może zatem uniemożliwiać interakcję toksyny z nabłonkiem jelitowym owada i dopiero jego usunięcie aktywuje cząsteczkę toksyny. Natomiast Lightwood i wsp. [51] analizowali rolę proteolizy w determinowaniu siły toksyny Cry1Ac przeciw gąsienicom bielinka kapustnika (*Pieris brassicae*) i piętnówki kapustnicy (*Mamestra brassicae*). Biotesty wykazały około 2000-krotnie większą toksyczność białka Cry1Ac w stosunku do *P. brassicae*, niż w stosunku do *M. brassicae*. Wyniki te sugerują występowanie u tych owadów różnego mechanizmu aktywacji toksyny, czyli proteolitycznego cięcia cząsteczki protoksyny, prawdopodobnie poprzez proteazę związaną z nabłonkiem jelitowym, a nie występującą w sokach trawiennych.

Asocjacja cząsteczki toksyny z nabłonkiem jelitowym wrażliwego owada jest powodowana zmianą konformacyjną poprzez zakłócenie interakcji pomiędzy domeną I i II, co powoduje insercję regionu domeny I w nabłonku [92]. Domena I zawiera 7 hydrofobowych alfa-helis (Rys. 2.), dzięki którym uczestniczy w formowaniu porów w nabłonku jelitowym owada [96]. Badania dotyczące tej domeny, przeprowadzone przez

Par k' a i Federici' ego [67] wykazały, iż w przypadku białka Cry3A, w krystalizacji toksyn domena I pełni istotną rolę. Toksyna wiąże się z nabłonkiem prawdopodobnie dzięki strukturze „spinki do włosów” zbudowanej z alfa-helisy 4 i 5, odpowiedzialnych za tworzenie światła poru. Po insercji struktury α -helisa4/ α -helisa5 w nabłonku jelitowym następuje jej oligomeryzacja, co prowadzi do końcowego kompleksu czterech monomerów. Badania prowadzone nad zjawiskiem oligomeryzacji sugerują, że jej brak skutkuje obniżeniem toksyczności, a udział w oligomeryzacji toksyny bierze reszta asparaginowa występująca w helisie alfa 4 [92]. Tworzenie porów w błonie nabłonka jelita organizmu wrażliwego następuje wg modelu koloidalno-osmotycznej lizy. Model ten zakłada napływ bogatej w jony wody powodujący pęcznienie komórek i ich lizę [82]. Białka Cry tworzą odmienne strukturalnie kanały jonowe, które różnią się konduktancją, przepuszczalnością jonów i kinetyką. Na typ i rozmiar poru ma wpływ pH. W środowisku zasadowym formowane kanały kationowe są większe, wykazując zwiększoną przepuszczalność dla jonów.

Domena II białka Cry, odpowiedzialna za wiązanie toksyny z receptorem, decyduje o specyficzności toksyny, co potwierdziły m.in. badania Jurat-Fuentes' a i Adan g' a [42]. Natomiast domena III, związana z utrzymaniem stabilności toksyny, może także brać udział w wiązaniu toksyny z receptorem. Mason i wsp. [61] wykazali, iż wysoce konserwatywny region domeny III odpowiedzialny jest za utrzymanie strukturalnej integralności protoksyny oraz pełnej funkcjonalności porów w błonie komórkowej. W biotestach stosowali oni mutanty, u których we wspomnianym regionie występujące w pozycjach 525, 527, 529 i 531 reszty argininowe zastąpili resztą glicynową lub asparaginową. Skonstruowane mutanty okazywały się mniej toksyczne w stosunku do owadów, niż natywne białka. Widoczne były także jakościowe różnice w ich zdolności integracji z nabłonkiem i kinetyka kanałów. Zamiany arginin nie wpływały natomiast znacząco na konduktancję kanałów. Wyniki tych badań sugerują, że odchylenia we właściwościach kanałów jonowych tworzonych przez zmutowane w regionie konserwatywnym domeny III toksyny są pośrednimi konsekwencjami strukturalnych zmian podczas integracji toksyn w nabłonku, prowadzących do niewłaściwej architektury poru poprzez niewielkie zmiany w transporcie jonów przez nabłonek jelitowy. Inne badania nad domeną III endotoksyn prowadzone przez De Magd i wsp. [12] dowodzą, iż domena III toksyny Cry1Ca funkcjonuje jako swoista determinanta u gąsienic światłówki naziemnicy (*Spodoptera exigua*) niezależnie od domen I i II. Autorzy skonstruowali hybrydowe białka zawierające domeny I i II pochodzące z różnych białek Cry1 połączone z trzecią domeną Cry1Ca. Wykazali,

iż różne białka Cry1, nawet takie, które nie są aktywne lub są mało aktywne wobec *S. exigua*, np. Cry1Ea i Cry1Ab, po połączeniu z domeną III toksyny Cry1Ca stały się aktywne wobec tych gąsienic.

Trzy domeny delta-endotoksyn poprzez interakcje tworzą przestrzenną strukturę i stanowią o aktywności białka. W utrzymaniu stabilności i funkcyjności toksyny prawdopodobnie udział biorą wiązania dwusiarczkowe łączące domeny I i II. Coux i wsp. [9] sugerują, iż obecność wewnątrzdomenowych mostków przyczynia się do stabilności protein w jelicie owada i zwiększa podatność protoksyn na działanie proteaz jelitowych. Okazuje się, że mutacje związane z tworzeniem mostków Asp²⁴²-Arg²⁶⁵ mają wpływ na ekspresję, stabilność i funkcje toksyn. Zaburzenie tworzenia mostków łączących domeny I i II skutkuje znaczącym spadkiem toksyczności białek Cry.

Techniki biologii molekularnej i genetyczne manipulacje poszerzyły i podniosły efektywność stosowanych toksyn wobec wielu nowych gatunków szkodników. Namov i wsp. [63], na przykład, skonstruowali hybrydowe białko wykazujące wysoką toksyczność w stosunku do larw stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata*). W swoich badaniach wykorzystali Cry1Ba i Cry1Ia, które są w niewielkim stopniu toksyczne w stosunku do tego gatunku. Okazało się, iż hybryda Cry1Ia/Cry1Ba jest bardziej toksyczna dla stonki niż białka macierzyste. Badania te wykazały także znaczenie domen endotoksyn jako istotnych determinant aktywności toksyn. Abdulla h i wsp. [1] potwierdzili możliwość przekształcania delta-endotoksyn w celu zwiększenia zakresu ich aktywności i specyficzności. Celem modyfikacji było białko Cry4Ba, toksyczne dla komarów z rodzaju *Anopheles* i *Aedes*, ale nie aktywne w stosunku do larw z rodzaju *Culex*. Uzyskany mutant okazał się wysoce toksyczny w stosunku do badanych gatunków komarów *Culex pipiens* oraz *C. quinquefasciatus*, wektorów groźnych pasożytniczych chorób tropikalnych – filarioz (np. słońiowacizny). Badania te sugerują, że niewielkie zmiany struktur toksyn mogą umożliwić projektowanie szerokiej gamy skutecznych białek Cry. Badania Park' a i wsp. [68] przedstawiają perspektywę usprawnienia syntezy endotoksyn. Sugerują oni, iż manipulacja niektórymi czynnikami wspomagającymi syntezę białek, tj. stabilizującą sekwencją 5' mRNA genu *cry3A*, czy białkami pomocniczymi, może dodatkowo usprawnić ich syntezę.

Przedmiotem zainteresowań badaczy są także toksyczne białka Cyt, które często występują w kryształach *B. thuringiensis* w kombinacji z białkami Cry, współdziałając synergistycznie, jak np. u *B. th. israelensis* [81]. Badania, prowadzone przez Wirth' a i wsp. [93, 95] prezentują skuteczność toksyn Cyt działających synergistycznie z toksynami *B. sphaericus*.

Dzięki kombinacji białek pochodzących od tych dwóch kryształotwórczych gatunków, uzyskano mieszaninę toksyn będącą stosunkowo bardziej aktywną dla różnych gatunków komarów, aniżeli białka stosowane osobno. Daje to możliwość skuteczniejszej walki z owadami, również tymi potencjalnie opornymi na poszczególne toksyny.

Niektóre szczepy *B. thuringiensis* poza znanymi delta-endotoksynami, produkują podczas wegetatywnego wzrostu komórek bakteryjnych również proteiny, które nie tworzą parasporalnych kryształów [82]. Owadobójcze białka, nazwane VIP, reprezentują strukturalnie inną grupę. Jak wynika z badań Lee i wsp. [49] mają odmienny niż endotoksyny mechanizm działania, który daje szansę na stworzenie insektycydów drugiej generacji.

Poza znanymi białkowymi czynnikami, niektóre szczepy *B. thuringiensis* produkują niebiałkowy metabolit znany jako β -egzotoksyna I [18]. Ten niespecyficzny nukleotydyowy analog, podobnie jak białka Cry, jest aktywny wobec różnych gatunków owadów, nieestety również tych nie będących obiektem zwalczania, np. pszczoł. Ponadto działa cytotoksycznie na komórki ssacze. Synteza i wydzielanie egzotoksyny prawdopodobnie wymaga aktywacji różnych genów, które jeszcze nie zostały zidentyfikowane. Wiadomo natomiast, że jej produkcja związana jest z obecnością plazmidów niosących geny *cry* [17]. Najnowsze badania nad β -egzotoksyną I dotyczą mechanizmów kontroli jej produkcji oraz możliwych powiązań pomiędzy podgatunkami *B. thuringiensis*, a zdolnością do syntezy egzotoksyny. Espinasse i wsp. [16, 18] zidentyfikowali u *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 geny kodujące białka związane z regulacją syntezy β -egzotoksyny I. Sekwencja aminokwasowa białek kodowanych przez grupę genów *sigW-ecfX-ecfY* wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji czynnika sigma, należącego do rodziny białek ECF, kontrolujących odpowiedź na warunki środowiska. Inne dwa geny *berA* i *berB* kodują białka stanowiące przypuszczalnie ABC transportery, podobne do systemów związanych z opornością na np. bakteriocyny. Dodatkowo na podstawie badań mutantu *B. thuringiensis* 407-1 (*Cry*⁻) niezdolnego do produkcji białek Cry autorzy udowodnili, że sekrecja egzotoksyny jest zależna od ekspresji genów plazmidowych. Okazuje się, że aktywacja ekspresji genu *sigW* jest warunkiem produkcji β -egzotoksyny u szczepu 407-1 (*Cry*⁻). U dzikiego szczepu 407-1, u którego *sigW* nie został aktywowany na początku fazy stacjonarnej, produkcja egzotoksyny zależna jest od genetycznych determinant zlokalizowanych na plazmidzie. Udział czynnika sigma w produkcji β -egzotoksyny sugeruje, że produkcja ta może być zapoczątkowywana w odpowiedzi na konkretne warunki środowiskowe.

β -egzotoksyna I jest metabolitem produkowanym tylko przez niektóre szczepy *B. thuringiensis*. Możliwe zależności pomiędzy serotypami *B. thuringiensis*, a produkcją egzotoksyny badali Hernandez i wsp. [31]. Wykorzystali 100 szczepów należących do podgatunków *B. thuringiensis*: *thuringiensis*, *kurstaki*, *aizawai* i *morrisoni*. Spośród badanych szczepów tylko w obrębie serotypu *B. th. thuringiensis* wykazano wysoką częstość produkcji egzotoksyny i tylko u dwóch szczepów *B. th. kurstaki*. Żaden z należących do podgatunku *B. th. aizawai* i *B. th. morrisoni* szczep nie produkował tego związku. Zgodnie z otrzymanymi wynikami autorzy proponują podział szczepów *B. thuringiensis* na powszechnie i rzadko produkujące β -egzotoksynę, a zależność pomiędzy podgatunkiem, a zdolnością do produkcji toksyny tłumaczą ewolucyjnym procesem różnicowania, kompatybilnością plazmidów i ograniczoną zdolnością wymiany plazmidów pomiędzy podgatunkami *B. thuringiensis*.

3. Docelowe – wrażliwe – organizmy i ich receptory

Już na początku XX wieku wiadomo było, że *Bacillus thuringiensis* działa najskuteczniej na wczesne stadia larwalne owadów [82]. Na przełomie lat 80. i 90. opisany został mechanizm działania toksyn na nabłonek jelitowy wrażliwych gatunków owadów. Molekularne mechanizmy tworzenia porów w błonie nabłonka jelita wrażliwego gatunku owada (przedstawione w rozdziale 2) są przedmiotem licznych analiz [2, 5, 61, 92]. Ostatnio przeprowadzono wiele badań w celu lepszego zrozumienia mechanizmu wiązania toksyna-receptor, a także zidentyfikowania miejsca wiązania na błonie nabłonka apikalnego owada. Okazało się, że poza białkami czy glikoproteinami, receptorem dla endotoksyny może być aminopeptydaza N, będąca miejscem wiązania dla Cry1Ac i Cry1Ab [40, 72], proteina typu kadheryny dla Cry1Ab [26, 35] a nawet struktura węglowodanowa wiążąca Cry5B [36]. Owady mogą posiadać kilka receptorów dla jednej toksyny lub osobny receptor dla każdej z toksyn. Herrero i wsp. [34] przedstawiają wyniki sugerujące, że wiele białek Cry posiada to samo miejsce wiązania w jelicie owada. Wiedza ta może być szczególnie użyteczna przy tworzeniu preparatów biologicznych zawierających mieszaniny endotoksyn.

Uważa się, że w organizmie owadów znajdują się jeszcze inne miejsca wiązania toksyn, niż tylko te opisane w jelicie. Cerstiaens i wsp. [7] jako pierwsi wykazali wpływ białek Cry także na komórki nerwowe owadów. Badania autorów ukazują, że w systemie nerwowym niektórych badanych owadów, np. brudnicy nieparki (*Lymantria dispar*) występują miejsca wiązania dla białka Cry1C, a podanie toksyn drogą iniekcji uruchamia odmienny od jelitowego mechanizm ich działania.

Z ostatnich badań wynika, że białka Cry mogą mieć szersze, niż tylko owadobójcze działanie. Okazało się, że kilka krystalicznych protein nie posiadających właściwości owadobójczych, wykazuje silne właściwości cytobójcze w stosunku do ludzkich komórek rakowych [39, 62, 64, 65]. Sekwencja aminokwasowa tych białek nie wykazuje homologii ze znanymi dotychczas toksynami Cry i Cyt. Sugeruje to, że nowo odkryte polipeptydy stanowią nową rodzinę endotoksyn *B. thuringiensis* o nowych możliwościach wykorzystania w medycynie.

4. Poszukiwania nowych toksyn *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis jest najczęściej wykorzystywanym mikroorganizmem w biologicznej kontroli owadów szkodliwych i będących wektorami chorób [2]. Powszechnie wiadomo, że większość z dotychczas wyizolowanych i stosowanych szczepów *B. thuringiensis* wykazuje aktywność bójczą wobec owadów łusko-skrzydłych (*Lepidoptera*), niektórych dwuskrzydłych (*Diptera*) i chrząszczy (*Coleoptera*). Na δ -endotoksyny wrażliwe są także niektóre gatunki z innych rzędów tj. *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Trichoptera* oraz niektóre pasożytnicze bezkręgowce, np. nicienie, przywry i roztocza. Preparaty dostępne na rynku oparte są głównie na szczepach podgatunków *B. th. kurstaki*, *B. th. israelensis* i *B. th. tenebrionis* [82].

Aktualnie prowadzone są badania nad wyizolowaniem szczepów *B. thuringiensis* i zidentyfikowaniem nowych rodzin owadobójczych krystalicznych białek będących bójczymi dla różnych szkodników upraw, pasożytów zewnętrznych utrudniającymi hodowlę zwierząt oraz wektorów chorób (Tabela I). Poszukiwanie nowych szczepów, zwłaszcza komarobójczych jest istotne ze względu na wciąż groźną malarię (rocznie umiera ok. 1,5–2 mln ludzi, głównie dzieci w Afryce) oraz inne tropikalne pasożyty, przenoszone przez wiele gatunków stawonogów [55].

Nawet najbardziej skuteczne w walce z komarami γ -endotoksyny *B. th. israelensis*, są światłoczułe i w środowisku ulegają fotodegradacji. W związku z tym

prowadzone są ciągle badania nad ulepszeniem preparatów zawierających *B. th. israelensis*, tak by zapewnić stabilność toksyny i ułatwić jej aplikację [89, 98]. Ósrodek Far-Manguinhos-Fiocruz z Rio de Janeiro zaproponował eksperymentalny preparat w formie tabletki o przedłużonym czasie działania, nazwany C4P1. Przeprowadzone symulowane biotesty, mające potwierdzić efektywność preparatu, wykazały jego długoterminowe działanie. Aktywność preparatu wystawionego na działanie promieni słonecznych była notowana po 13–35 dniach, natomiast pozostawionego w cieniu nawet po 40–54 dniach. Daje to większe możliwości wykorzystywania go w warunkach naturalnych do skutecznej redukcji liczebności larw komarów w nawsłoneczonych zbiornikach wodnych.

5. Rozwój oporności na δ -endotoksyny

Dotychczas badania laboratoryjne potwierdziły zdolność różnych gatunków owadów do wykształcania oporności na toksyny *B. thuringiensis* [21, 24]. W wielu takich przypadkach przyczyną uzyskiwania oporności u owadów był zanik miejsca wiązania toksyn w nabłonku jelitowym owada. Wykazano, między innymi, redukcję wiązania białek Cry do nabłonka jelitowego roślinożernych gąsienic *Plutella xylostella*, *Pectinophora gossypiella* i *Heliothis virescens*. [43, 79, 87]. Badania H e r r e r o i w s p. [33] wykazały jednak bardziej złożony mechanizm oporności owadów na toksyny *B. thuringiensis*. Sugeruje to, że za oporność może być odpowiedzialnych kilka genów. W innej pracy H e r r e r o i w s p. [32] sugerują udział w oporności *P. xylostella* izoenzymu MPI. Odkryli oni silną korelację pomiędzy opornością na Cry1A, a obecnością MPI w populacji *P. xylostella*. Natomiast S a y y e d i w s p. [80] przedstawiają jeszcze jeden możliwy model oporności owadów, poprzez dezaktywację cząsteczeki toksyny.

Laboratoryjne testy dotyczące opornych na toksyczne białka szczepów owadów dostarczają wiedzy o możliwych mechanizmach oporności. Traktowanie szkodników mieszaninami endotoksyn spowodowało

Tabela I

Spektrum aktywności δ -endotoksyn nowo wyizolowanych szczepów *B. thuringiensis*

Organizm docelowy	Szczep <i>Bacillus thuringiensis</i>	Piśmiennictwo
Chrząszcze: – <i>Diabrotica virgifera</i> (szkodnik kukurydzy) – <i>Conopomorpha cramerella</i> (szkodników drzew kakaowych)	<i>B. thuringiensis</i> PS80JJ1, PS167H2, PS149B1 <i>B. thuringiensis</i> Berliner	[14] [78]
Muchówki: – <i>Haematobia</i> , <i>Lucilia</i>	Izolaty o nieznanym profilu	[25]
Komary: – <i>Culex sitiens</i> , <i>C. quinquefasciatus</i> , <i>C. tritaeniorhynchus</i> , <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Aedes aegypti</i>	<i>B. th. thompsoni</i> , <i>B. th. japonensis</i> , <i>B. th. yoso</i> , <i>B. th. jinghongiensis</i>	[55, 56, 58, 60]

wystąpienie oporności krzyżowej. Herrero i wsp. [34], po przeprowadzeniu badań na gąsienicach 6 gatunków motyli, wykazali, że białka Cry1Ac i Cry1Ja konkurują o miejsce wiązania na receptorze, co może być przyczyną występowania oporności krzyżowej.

W związku z możliwością rozwoju u owadów oporności na γ -endotoksyny, a w szczególności oporności krzyżowej, ważne jest poznanie interakcji pomiędzy toksynami. W walce ze szczepami opornymi pomocne mogą być białka mające różne miejsca wiązania. Przykładem są badania nad opornymi na toksyny *B. th. israelensis* komarami *C. quinquefasciatus*, które okazały się wrażliwe na białka pochodzące od *B. th. jegathesan* [94].

6. Genetyka *Bacillus thuringiensis*

Już na początku lat 90. Carlson i Kolsto [6] skonstruowali kompletną fizyczną mapę chromosomu *Bacillus thuringiensis* o wielkości 2,4–5,7 mln bp. Wiadomo, że geny toksycznych białek zlokalizowane są albo na dużych plazmidach (obecnych u większość szczepów *B. thuringiensis* w formie zarówno liniowej, jak i kolistej) albo – rzadziej – na chromosomie. Plazmidy niosące geny *cry* są przeważnie plazmidami koniugacyjnymi, a ich biorcami mogą być różne gatunki z rodzaju *Bacillus* [82]. Thomas i wsp. [90, 91] sugerują, iż koniugacja jest ważnym sposobem szerzenia się genów toksyn pomiędzy populacjami laseczek *Bacillus* w naturze i daje możliwość – w warunkach laboratoryjnych – konstrukcji szczepów produkujących nowe kombinacje toksyn. W przenoszeniu genów toksyn do innych szczepów pośredniczyć mogą również fagi, które występują w niektórych szczepach *B. thuringiensis*.

Intensywne badania z lat 90. dotyczące genomu *B. thuringiensis* zaowocowały wieloma odkryciami. Berry i wsp. [4] przedstawili kompletną sekwencję i organizację plazmidu pBtoxis *B. th. israelensis*, wykazując nieznanе dotąd geny *cyt*. Balasubramanian i wsp. [3] scharakteryzowali nowy gen *cry32Aa* pochodzący od *B. th. yunnanensis*, kodujący białko o słabej aktywności wobec tantnisi krzyżowiaczka (*P. xylostella*). Natomiast Lee i wsp. [50] wykryli, w genomie wielu szczepów *B. thuringiensis*, gen *aiiA*, kodujący enzym degradujący lakton AHL, związek będący uniwersalnym sygnalizatorem, charakterystyczny dla bakterii Gram-ujemnych. W związku z tym, iż wiele bakterii używa AHL do regulacji wirulencji, autorzy sugerują, że zakłócenie przez *B. thuringiensis* bakteryjnego systemu komunikacji może zapobiegać infekcji, np. powodowanej przez pałeczki *Erwinia carotovora*. Fakt, iż szczepy *B. thuringiensis* posiadają enzymy degradujące AHL, może pomóc w stworzeniu strategii walki z wieloma bakteryjnymi patogenami roślin.

Poznanie sekwencji i zrozumienie mechanizmu realizacji informacji genetycznej *B. thuringiensis* umożliwiło pozyskiwanie pożądanych rekombinantów zawierających określone geny γ -endotoksyn. Techniki rekombinacji DNA stosowane są więc do doskonalenia skuteczności owadobójczej bakterii poprzez, np. wyraźny wzrost syntezy owadobójczych białek czy też produkcję (przez jeden szczep) kombinacji toksyn pochodzących od różnych szczepów [19]. Kombinowane białka Cry i Cyt wraz z toksynami pochodzącymi od *B. sphaericus* poprawiają skuteczność biopreparatów przeciw komarom z rodzaju *Culex*. Park i wsp. [69] skonstruowali szczep *B. thuringiensis* produkujący białka Cyt1A, Cry11A i toksynę *B. sphaericus*, wykazując większą skuteczność szczepów rekombinowanych w stosunku do oddzielnych szczepów *B. thuringiensis* i *B. sphaericus*.

Inżynieria genetyczna umożliwiła także konstruowanie transgeniczných organizmów i ekspresję toksyn u innych gatunków. Na przykład *E. coli*, o zmienionym genotypie, może produkować toksyczne białka. Geny *B. thuringiensis* i *B. sphaericus* ulegając ekspresji w komórkach tych bakterii, nadają im właściwości owadobójczych, co pokazuje, że bakterie te mogą być wykorzystywane jako potencjalne, bardziej stabilne czynniki w kontroli owadów [44, 88]. Pozyskiwanie nowych szczepów otworzyło możliwość konstrukcji szeregu bardziej efektywnych insektycydów [19]. Inceoglu i wsp. [38] sugerują wykorzystanie rekombinowanych wirusów zawierających geny *B. thuringiensis* do kontroli owadów niezależnie od stosowanych bioinsektycydów.

Techniki rekombinacji DNA mające na celu usprawnienie syntezy delta-endotoksyn nie koncentrują się jedynie na genach toksycznych białek. Zwiększenie trwałości toksyn uzyskać można także poprzez stworzenie warunków chroniących ich cząsteczki przed zniszczeniem. Wiadomo, że białka Cry ulegają fotodegradacji pod wpływem promieni UV. Stwierdzono, że barierą zabezpieczającą toksyny może być pigment produkowany w komórkach *B. thuringiensis*. Ruani i wsp. [73, 74] stworzyli rekombinowany szczep *B. thuringiensis* zawierający gen *mel* pochodzący od pałeczek *Stenotrophomonas (Pseudomonas) maltophilia*. Dzięki produkcji melaniny szczepy *B. thuringiensis* stają się odporne na działanie promieni UV, co zapewnia stabilność cząsteczkom endotoksyn i dłuższy ich czas działania.

7. Ekologia *Bacillus thuringiensis*

Saprophytyczne laseczki *Bacillus thuringiensis* występują powszechnie w różnych środowiskach. Szczepy tego gatunku są izolowane z gleby, powierzchni

liści oraz z jelit owadów [13, 82]. W każdym z tych środowisk oddziałują na laseczki różne czynniki, które mają wpływ na ich wzrost oraz na sporulację. Poznanie środowiskowych uwarunkowań produkcji δ -endotoksyn jest istotne z praktycznego i technologicznego punktu widzenia. Produkcja endotoksyn w warunkach przemysłowych jest bowiem procesem kosztownym, co ogranicza stosowanie preparatów opartych na *B. thuringiensis*. Nowe i tanie podłoże, na którym można produkować białka Cry zaproponowali P o o p a t h i i wsp. [70, 71]. Alternatywne podłoże fermentacyjne (do hodowli *B. th. israelensis* i *B. sphaericus*) bazuje na ekstrakcie z ziemniaków. Jest ono tanie, zatem bardzo użyteczne ze względów ekonomicznych, a przeprowadzone próby pokazują porównywalną produkcję toksyn w stosunku do podłoży tradycyjnych (LB). W biotestach krystaliczne białka (wyprodukowane na nowym podłożu) są efektywne w odniesieniu do komarów *C. quinquefasciatus*, *A. stephensi* i *A. aegypti*.

Wymagania środowiskowe *B. thuringiensis* poznaje się w warunkach laboratoryjnych analizując wzrost szczepów na specyficznych podłożach, na których dochodzi do produkcji δ -endotoksyn. W aktualnie prowadzonych badaniach analizowany jest wpływ różnych substancji odżywczych i hodowlanych na laseczki *Bacillus*. Z badań I ç g e n' a i wsp. [37] wynika, że wpływ na syntezę białkowych komponentów mogą mieć magnez i miedź, zaś brak cynku i wapnia nie wpływa negatywnie na produkcję toksyn. W innych badaniach R u m i n g i wsp. [75] testowali wpływ na sporulację *B. thuringiensis* jonów samaru, który w wyższym stężeniu może hamować tworzenie spor. Ö z k a n i wsp. [66] potwierdzają, że związki nieorganiczne mogą stymulować produkcję białek Cry, ale także niektóre związki organiczne, np. inulina, dekstryna, laktoza, czy glicerol.

Jak dowiedli L a c h o w i c z i wsp. [47], L-seryna dodana do podłoża minimalnego zatrzymuje wzrost testowanych gatunków *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pantothenicus*, z wyjątkiem kryształotwórczego *B. thuringiensis*. Analogicznie, seryna znana jest od długiego czasu, jako inhibitor wzrostu *Escherichia coli* [11]. Zatrzymanie wzrostu poprzez serynę dodaną do podłoża jest u *E. coli* powodowane inhibicją dehydrogenazy homoserynowej, uczestniczącej w biosyntezie treoniny [27, 28]. Obecność seryny w podłożu powoduje zatem głód treoninowy uniemożliwiający wzrost bakterii [47]. Zjawisko inhibicji serynowej gatunków *Bacillus* i *E. coli* ma więc prawdopodobnie takie samo podłoże, natomiast fenomen wzrostu na podłożu minimalnym z seryną szczepów *B. thuringiensis* wymaga wyjaśnienia. Zjawisko to mogłoby być wykorzystane, np. do pozytywnej selekcji szczepów *B. thuringiensis* bezpośrednio ze śro-

dowiska. Izolacja szczepów w oparciu o zjawisko inhibicji serynowej mogłaby bowiem znacząco skrócić czas potrzebny na zidentyfikowanie nowych izolatów, będących źródłem różnorodnych toksyn przydatnych w biologicznej kontroli, głównie szkodników i wektorów chorób.

8. Bezpieczeństwo *Bacillus thuringiensis* dla człowieka

Dotychczas biopreparaty oparte na *B. thuringiensis*, postrzegano jako bezpieczne dla innych organizmów nie będących przedmiotem zwalczania, np. dla występujących w biocenozach bezkręgowców i kręgowców. Jednakże bliskie pokrewieństwo *B. thuringiensis* z *B. cereus*, który jest przyczyną zatruc pokarmowych, wzbudza obawy co do bezpiecznego stosowania tych bioinsektycydów. Z nielicznych doniesień wynika, iż niektóre szczepy *B. thuringiensis* są zdolne do produkcji enterotoksyn i bywają przyczyną zatruc pokarmowych oraz posiadają geny znane u *B. cereus*, jako geny związane z patogennością [25]. Badania H a n s e n' a i H e n d r i k s e n' a [29] potwierdziły obecność genów kodujących enterotoksyczny kompleks HBL oraz trzy inne geny enterotoksyn w większości testowanych szczepów *B. thuringiensis*. Sporadyczne doniesienia sugerują możliwość powodowania (przez niektóre szczepy *B. thuringiensis*) infekcji jamy ustnej, oka czy infekcji ogólnoustrojowych [30]. W badaniach J e n s e n' a i wsp. [41] oraz V a l a d a r e s d e A m o r i m i wsp. [97] izolowano wprawdzie szczepy *B. thuringiensis* od pracowników leśnych, którzy mieli styczność z biopreparatami, jednakże u badanych nie wystąpiły żadne objawy chorobowe, co potwierdza bezpieczeństwo stosowania tych preparatów [85]. G h e l a r d i i wsp. [22] opierając się na wcześniejszych doniesieniach, sugerują, że istotną rolę w wirulencji laseczek *B. thuringiensis* odgrywa ich ruchliwość. Jako pierwsi przedstawiają wyniki świadczące o tym, iż dotychczas nie opisywany u *B. thuringiensis* gen *flhA* jest odpowiedzialny za ruchliwość bakterii, różnicowanie komórek i sekrecję protein związanych z wirulencją tj. HBL i PC-PLC. S a l a m i t o u i wsp. [77] sugerują, iż regulatorem genów kodujących czynniki potencjalnie związane z patogennością *B. thuringiensis* jest PlcR. Obserwowane syndromy u testowanych laboratoryjnie myszy wskazują na udział hemolizyn, z kolei biotesty z wykorzystaniem mutantów sugerują, że patogenność *B. thuringiensis* wymaga czynników, które są zależne od aktywności PlcR. Obserwację taką potwierdzają w swych badaniach F e d h i l a i wsp. [20] wskazując na wcześniej opisywaną metaloproteazę InhA2, która jest także regulowana przez PlcR.

9. Podsumowanie

Wszechstronne badania, prowadzone od prawie stu lat, zaowocowały wykorzystaniem *Bacillus thuringiensis* przede wszystkim w produkcji specyficznych bioinsektycydów, konkurencyjnych dla niespecyficznych preparatów chemicznych. W latach 1961–1995, Agencja Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych zarejestrowała 177 preparatów opartych na *B. thuringiensis*, a na początku 1998 roku ich liczba wzrosła do prawie 200 [82]. Wzrost zainteresowania własnościami szczepów oraz delta-endotoksyn powodowany jest możliwościami szerokiego wykorzystania tych entomopatogennych laseczek w kontroli coraz to nowych owadów-szkodników roślin, innych organizmów pasożytniczych, a nawet w terapii nowotworowej. Prowadzone na szeroką skalę badania nad *B. thuringiensis* mają na celu przede wszystkim zidentyfikowanie nowych szczepów i nowych białek Cry, które w przyszłości mogą stanowić źródło biopreparatów. Izolacja i selekcja kryształotwórczych szczepów *B. thuringiensis* ma istotne znaczenie z punktu widzenia poszerzenia spektrum działania wobec innych gatunków stawonogów, będących szkodnikami bądź wektorami chorób infekcyjnych i inwazyjnych. Duża liczba zidentyfikowanych szczepów i endotoksyn jest niezbędna także w związku z możliwością wykształcenia się cechy oporności wśród owadów będących celem działania. Ponadto nowe izolaty potrzebne są do konstrukcji organizmów transgenicznych, zarówno bakterii, jak i roślin, które wykorzystywane będą do walki z organizmami niedostępnymi dla obecnie stosowanych preparatów opartych na *B. thuringiensis* oraz łączących cechy, np. motylobójcze z chrząszczobójczymi, w celu kontroli mieszanych inwazji szkodników.

Badania dotyczące biologii laseczek, a zwłaszcza ich wymagań pokarmowych oraz środowiskowych uwarunkowań syntezy δ -endotoksyn mogą usprawnić metody izolacji i selekcji kryształotwórczych szczepów, w oparciu o ich cechy fizjologiczne, takie jak np. różnicująca, od innych gatunków *Bacillus*, zdolność do wzrostu na podłożu minimalnym z seryną.

Piśmiennictwo

1. Abdullah M.A.F., Alzate O., Mohammad M., McNall R.J., Adang M.J., Dean D.H.: Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5343–5353 (2003)
2. Aronson A.I., Shai Y.: Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 1–8 (2001)
3. Balasubramanian P., Jayakumar R., Shambharkar P., Unnamalai N., Pandian S.K., Ilangovan R., Kumaraswami S.N., Sekar V.: Cloning and characterization of the crystal protein-encoding gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 408–411 (2002)
4. Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A. F., Murphy L., Quail M.A., Holden M.T.G., Harris D., Zaritsky A., Parkhill J.: Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5082–5095 (2002)
5. Bravo A., Sánchez J., Kouskoura T., Crickmore N.: N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 23985–23987 (2002)
6. Carlson C.R., Kolsto A.B.: A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.* **175**, 1053–1060 (1993)
7. Cerstiaens A., Verleyen P., Van Rie J., Van Kerkhove E., Schwartz J-L., Laprade R., de Loof A., Schoofs L.: Effect of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in insect hemolymph and their neurotoxicity in brain cells of *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3923–3927 (2001)
8. Chang L., Grant R., Aronson A.: Regulation of the packing of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins into inclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5032–5036 (2001)
9. Coux F., Vachon V., Rang C., Moozar K., Masson L., Royer M., Bes M., Rivest S., Brousseau R., Schwartz J-L., Laparde R., Frutos R.: Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**, 35546–35551 (2001)
10. Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean H.: Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807–813 (1998)
11. Dachin A., Dondon L.: Serine sensitivity of *Escherichia coli* K12: partial characterization of a serine resistant mutant that is extremely sensitive to 2-ketobutyrate. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 155–164 (1980)
12. De Maagd R.A., Weemen-Hendriks M., Stiekema W., Bosch D.: *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1559–1563 (2000)
13. Doroszkiewicz W., Lonc E.: Biodiversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the phylloplane and soil of Lower Silesia region (Poland). *Acta Microbiol. Polon.* **48**, 355–361 (1999)
14. Ellis R.T., Stockhoff B.A., Stamp L., Schnepf H.E., Schwab G.E., Knuth M., Russell J., Cardineau G.A., Narva K.E.: Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1137–1145 (2002)
15. Enwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., Higgs S.: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. John Wiley & Sons, Chichester, New York 1993
16. Espinasse S., Gohar M., Lereclus D., Sanchis V.: An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β -exotoxin I production. *J. Bacteriol.* **184**, 5848–5854 (2002)
17. Espinasse S., Gohar M., Chaufaux J., Buisson C., Perchat S., Sanchis V.: Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4182–4186 (2002)
18. Espinasse S., Gohar M., Lereclus D., Sanchis V.: An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling β -exotoxin I production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 407-1. *J. Bacteriol.* **186**, 3108–3116 (2004)

19. Federici B.A., Park H.W., Bideshi D.K., Wirth M.C., Johnson J.J.: Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Experim. Biol.* **206**, 3977–3885 (2003)
20. Fedhila S., Gohar M., Slamti L., Nel P., Lereclus D.: The *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene *inhA2* is necessary, but not sufficient, for virulence. *J. Bacteriol.* **185**, 2820–2825 (2003)
21. Ferré J., Van Rie J.: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* **47**, 501–533 (2002)
22. Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Beecher D. J., Gominet M., Lereclus D., Wong A.C.L., Senesi S.: Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **184**, 6424–6433 (2002)
23. Glare T.R., O'Callaghan M.: *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley & Sons, Ltd. UK 2000
24. González-Cabrera J., Herrero S., Ferré J.: High genetic variability for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in a single population of diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5043–5048 (2001)
25. Gough J.M., Akhurst R.J., Ellar D.J., Kemp D.H., Wijffels G.L.: New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control livestock ectoparasites. *Biol. Control.* **23**, 179–189 (2002)
26. Gómez I., Oltean D.I., Gill S.S., Bravo A., Soberón M.: Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* **276**, 28906–28912 (2001)
27. Hama H., Sumita Y., Kakutani Y., Tsuda M., Tsuchiya T.: Target of serine inhibition in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 1211–1216 (1990)
28. Hama H., Kayahara T., Tsuda M., Tsuchiya T.: Inhibition of homoserine dehydrogenase I by L-serine in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **109**, 604–608 (1991)
29. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 185–189 (2001)
30. Helgason E., Caugant D. A., Olsen I., Kolstø A-B.: Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1615–1622 (2000)
31. Hernandez C.S., Martinez C., Porcar M., Caballero P., Ferre J.: Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I beta-exotoxin production. *J. Invertebr. Pathol.* **82**, 57–62 (2003)
32. Herrero S., Ferré J., Escrache B.: Mannose Phosphate isomerase isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in lepidopteran species. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 979–981 (2001)
33. Herrero S., Oppert B., Ferré J.: Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1085–1089 (2001)
34. Herrero S., González-Cabrera J., Tabashnik B. E., Ferré J.: Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5729–5734 (2001)
35. Hua G., Jurat-Fuentes J. L., Adang M. J.: Bt-R_{1a} extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 28051–28056 (2004)
36. Huffman D.L., Bischof L.J., Griffiths J.S., Aroian R.V.: Pore worms: Using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 599–607 (2004)
37. İçgen Y., İçgen B., Özcengiz G.: Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Res. Microbiol.* **153**, 599–604 (2002)
38. Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hinton A.C., Huang Q., Severson T.F., Kang K-d, Hammock B.D.: Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Manag. Sci.* **57**, 981–987 (2001)
39. Ito A., Sasaguri Y., Kitada S., Kusaka Y., Kuwano K., Masutomi K., Mizuki E., Akao T., Ohba M.: A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 21282–21286 (2004)
40. Jenkins J. L., Dean D. H.: Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. *BMC Biochemistry*, **2**, 12–20 (2001)
41. Jensen G.B., Larsen P., Jacobsen B.L., Madsen B., Smidt L., Andrup L.: *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4900–4905 (2002)
42. Jurat-Fuentes J.L., Adang M.J.: Importance of Cry1 δ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 323–329 (2001)
43. Jurat-Fuentes J.L., Gould F.L., Adang M.J.: Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggest multiple mechanisms of resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5898–5906 (2003)
44. Khasdan V., Ben-Dov E., Manasherob R., Boussiba S., Zaritsky A.: Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Environ. Microbiol.* **3**, 798–806 (2001)
45. Krieg A.: Die Entdeckung des *Bacillus thuringiensis* durch Dr. Ernst Berliner: ein Meilenstein der Insectenpathologie und mikrobiologischen Bekämpfung von Schadinsekten. In Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem (Eds. Krieg A., Huger A. M.), Heft 233, pp. 11–24, Paul Parey, Berlin 1986
46. Kucińska J., Lonc E., Rydzanicz K.: Nieprzyjazne pasożytność a przyjazne środowisku transgeniczne bioinsektycydy. *Wiad. Parazytol.* **49**, 11–20 (2003)
47. Lachowicz T.M., Morzejkó E., Panek E., Piątkowski J.: Inhibitory action of serine on growth of bacteria of the genus *Bacillus* on mineral synthetic media. *Folia Microbiol.* **41**, 21–25 (1996)
48. Lecadet M-M., Frachon E.E., Cosmao Dumanior V., Ripoteau H., Hamon P., Laurent P., Thiery I.: Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 660–672 (1999)
49. Lee M.K., Walters F. S., Hart H., Palekar N., Chen J-S.: The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4648–4657 (2003)
50. Lee S.J., Park S-Y., Lee J-J., Yum D-Y., Koo B-T., Lee J-K.: Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3919–3924 (2002)
51. Lightwood D.J., Ellar D.J., Jarrett P.: Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5174–5181 (2000)
52. Lonc E., Rydzanicz K., Gomułkiewicz B.: Monitoring środowiskowy i zwalczanie miejskich populacji komarów (Diptera: Culicidae) we Wrocławiu. *Wiad. Parazytol.* **50**, 571–578 (2004)
53. Lonc E., Lachowicz T.M.: Parasporalne kryształki *Bacillus thuringiensis* jako środek specyficznej kontroli owadów. *Post. Mikrobiol.* **2**, 265–282 (1992)

54. Lonc E., Lecadet M.-M., Lachowicz T.M., Panek E.: Description of *Bacillus thuringiensis wratislaviensis* (H-47), a new serotype originating from Wrocław (Poland), and other Bt soil isolates from the same area. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 467–473 (1997)
55. Lonc E., Kucińska J., Rydzanicz K.: Toksyczność wrocławskich izolatów *Bacillus thuringiensis* wobec larw *Aedes aegypti*. *Wiad. Parazytol.* **47**, 297–303 (2001)
56. Lonc E., Doroszkiewicz W., Klownden M.J., Rydzanicz K., Galgan A.: Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against dipteran larvae. *J. Vec. Ecol.* **26**, 15–20 (2001)
57. Lonc E., Mazurkiewicz M., Doroszkiewicz W., Kołpa A., Mańka M.: Mikrobiologiczne zwalczanie larw chrząszczy *Alphitobius diaperinus* i *Tenebrio molitor* – szkodników paszy. *Med. Wet.* **57**, 258–262 (2001)
58. Lonc E., Kucińska J., Rydzanicz K.: Comparative delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against mosquito vectors (*Aedes aegypti* and *Culex pipiens*). *Acta Microbiol. Polon.* **52**, 293–300 (2003)
59. Malinowski H.: Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w ochronie roślin: perspektywy i ograniczenia. *Biotechnologia*, **3**, 81–92 (2000)
60. Manonmani A., Balaraman K.: A highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* var. *thompsoni*. *Curr. Sci.* **80**, 779–781 (2001)
61. Masson L., Tabashnik B.E., Mazza A., Préfontaine G., Potvin L., Brousseau R., Schwartz J.-L.: Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 194–200 (2002)
62. Mizuki E., Park Y.S., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K., Ohba M.: Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.* **7**, 625–634 (2000)
63. Naimov S., Weemen-Hendriks M., Dunkiandjiev S., de Maagd R.A.: *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5328–5330 (2001)
64. Namba A., Yamagiwa M., Amano H., Akao T., Mizuki E., Ohba M., Sakai H.: The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis* A1519 strain against the leukemic T cell. *Biochem. Biophys. Acta*, **1622**, 29–35 (2003)
65. Okumura S., Akao T., Higuchi K., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M., Inouye K.: *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongensis* strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic protein with similar masses against human cancer cells. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 89–92 (2004)
66. Özkan M., Dilek F. B., Yetis Ü., Özcengiz G.: Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Res. Microbiol.* **154**, 49–53 (2003)
67. Park H.W., Federici B.A.: Domain I plays an important role in the crystallization of Cry3A in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Biotechnol.* **16**, 97–107 (2000)
68. Park H.W., Bideshi D.K., Federici B.A.: Molecular genetic manipulation of truncated Cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4449–4455 (2000)
69. Park H.W., Bideshi D.K., Federici B.A.: Recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* producing Cyt1A, Cry11B, and the *Bacillus sphaericus* binary toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1331–1334 (2003)
70. Poopathi S., Kumar A., Arunachalam N., Tyagi B.K., Sekar V.: Control of *Culex quinquefasciatus* by *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, produced on a new potato extract culture medium. *Biocontrol Sci. Tech.* **13**, 743–748 (2003)
71. Poopathi S., Kumar K.A.: Novel fermentation media for production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Econ. Entomol.* **96**, 1039–1044 (2003)
72. Rajagopol R., Sivakumar S., Agrawal N., Malhotra P., Bhatnagar R.K.: Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 46849–46851 (2002)
73. Ruan L., Huang Y., Zhang G., Yu D., Ping S.: Expression of the *mel* gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 244–248 (2002)
74. Ruan L., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y., Shen P.: Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 286–189 (2004)
75. Ruming Z., Yi L., Wenhua L., Ping S., Songsheng Q., Ziniu Y.: Effect of Sm³⁺ ion on growth of *Bacillus thuringiensis* by microcalorimetry. *Biol. Trace Elem. Res.* **95**, 269–178 (2003)
76. Rydzanicz K., Lonc E., Puzio A., Markiewicz M.: Próby integrowanej kontroli komarów na terenie miasta i okolic Wrocławia. *Biuletyn Polskiego Stowarzyszenia Pracowników DDD.* **20**, 8–10 (2000)
77. Salamitou S., Ramišse F., Brehélin M., Bourguet D., Gilois N., Gominet M., Hernandez E., Lereclus D.: The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insect. *Microbiology*, **146**, 2825–2832 (2000)
78. Santos D., Chaidamsari T., Wiryadiputra S., de Maagd R. A.: Activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against cocoa borer larvae. *Pest Manag. Sci.* **60**, 735–738 (2004)
79. Sayyed A.H., Haward R., Herrero S., Ferré J., Wright D.J.: Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1509–1516 (2000)
80. Sayyed A.H., Gatsi R., Kouskoura T., Wright D.J., Crickmore N.: Susceptibility of a field-derived, *Bacillus thuringiensis*-resistant strain of diamondback moth to in vitro-atcived Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4372–4373 (2001)
81. Sayyed A.H., Crickmore N., Wright D.J.: Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamond moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5859–5861 (2001)
82. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie, Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
83. Sedlak M., Walter T., Aronson A.: regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *J. Bacteriol.* **182**, 734–741 (2000)
84. Shao Z., Liu Z., Yu Z.: Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5362–5369 (2001)
85. Siegel J. P.: Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invert. Pathol.* **77**, 13–21 (2001)
86. Staples N., Ellar D., Crickmore N.: Cellular localization and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystallization factor. *Curr. Microbiol.* **42**, 388–392 (2001)

87. Tabashnik B.E., Liu Y-B., de Maagd R.A., Dennehy T.J.: Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4582–4584 (2000)
88. Tanapongpipat S., Luxananil P., Promdonkoy B., Chewawiwat N., Audtho M., Panyim S.: A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 259–263 (2003)
89. Teera-Arunsi A., Suphantharika M., Ketunuti U.: Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *J. Econ. Entomol.* **96**, 292–299 (2003)
90. Thomas D.J.I., Morgan J.A.W., Whipps J.M., Saunders J.R.: Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and lepidopteran and colepteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 118–124, (2000)
91. Thomas D.J.I., Morgan J.A.W., Whipps J.M., Saunders J.R.: Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 330–338 (2001)
92. Tigue N.J., Jacoby J., Ellar D.J.: The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5715–5720 (2001)
93. Wirth M.C., Federici B.A., Walton W.E.: Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1093–1097 (2000)
94. Wirth M.C., Delécluse A., Walton W.E.: Lack of cross-resistance to Cry19A from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1956–1958 (2001)
95. Wirth M.C., Delécluse A., Walton W.E.: Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3280–3284 (2001)
96. Vachon V., Préfontaine G., Coux F., Rang C., Marceau L., Masson L., Brousseau R., Frutos R., Schwartz J.L., Laprade R.: Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry*, **41**, 6178–6184 (2002)
97. Valadares de Amorim G., Whittome B., Shore B., Levin D. B.: Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1-like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1035–1043 (2001)
98. Varjal de Melo-Santos M.A., Gomes Sanches E., de Jesus F.J., Regis L.: Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96**, 1–2 (2001)
99. Xu Y., Nagai M., Bagdasarian M., Smith T.W., Walker E.D.: Expression of the p20 gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases Cry11A toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in recombinant gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3 010–3015 (2001)

Panu Profesorowi Tadeuszowi M. Lachowiczowi składamy serdeczne podziękowania za zainteresowanie tematem inhibicji serynowej szczepów *B. thuringiensis* oraz za życzliwą weryfikację treści maszynopisu.

Waldemar Rastawicki, Marek Jagielski

Zakład Bakteriologii, Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa
tel. (22) 542 12 40, e-mail: mjagielski@pzh.gov.pl

Wpłynęło w grudniu 2004 r.

1. Wstęp. 2. Czynniki etiologiczne. 3. Patogeneza zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*. 4. Występowanie tularemii na świecie. 5. Objawy kliniczne. 6. Laboratoryjna diagnostyka. 7. Chemioterapia zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*. 8. Szczepienia ochronne. 9. Tularemia jako broń biologiczna. 10. Podsumowanie

Tularemia

Abstract: Tularemia is a zoonosis caused by *Francisella tularensis*, a gram-negative, small facultative intracellular bacterium. *F. tularensis* is found in widely diverse animal hosts and habitats and can be recovered from contaminated water, soil, and vegetation. Humans acquire infection through bites ticks, flies, and mosquitoes and by contact with animals, especially rodents. Two subspecies of *F. tularensis* are recognised on the basis of cultural characteristics, epidemiology, and virulence—*tularensis* (Type A) in North America and *holarctica* (Type B) in Eurasia. Tularemia is characterised by fever, apathy and septicaemia. In humans, there may be ulcers or abscesses at the site of inoculation and swelling of the regional lymph nodes. Because the causative agent of tularemia, *F. tularensis*, is one of the most infectious pathogenic bacteria known it may be used as a potential biological weapon.

1. Introduction. 2. Etiological agent. 3. Pathogenesis of *F. tularensis* infections. 4. Occurrence of tularemia in the World. 5. Clinical manifestations. 6. Laboratory diagnosis. 7. Chemotherapy of *F. tularensis* infections. 8. Protective vaccination. 9. Tularemia as a biological weapon. 10. Summary

Słowa kluczowe: *Francisella tularensis*, patogeneza, diagnostyka, chemioterapia, szczepienia, broń biologiczna
Key words: *Francisella tularensis*, pathogenicity, diagnostics, chemotherapy, vaccination, biological weapon

1. Wstęp

Tularemia jest ostrą, odzwierzęcą chorobą zakaźną, występującą w naturalnych warunkach wśród gryzoni i zającowatych, nazywaną czasami „chorobą zajęczą” lub „dżumą gryzoni”, wywołowaną przez *Francisella tularensis*, względnie tlenową, Gram-ujemną ziarniako-pałeczkę. Choroba występuje u ssaków, ptaków, płazów, ryb a nawet u bezkręgowców. Naturalnym rezerwuarem *F. tularensis* są myszy, szczury, nornice, wiewiórki, króliki, zające oraz inne zwierzęta, głównie gryzonie [7, 9, 49, 76]. Ludzie zarażają się pałeczkami *F. tularensis* poprzez ukąszenia owadów, kontakt z zakażonymi tkankami zwierząt, skażoną ziemią, spożyciem skażonej wody i żywności jak też drogą aerogenną. Tularemia u ludzi może przybierać różne formy w zależności od drogi wniknięcia do organizmu. Pomimo, że jest ona uważana za chorobę przebiegającą w ostrej postaci, w wielu przypadkach może przebiegać w formie łagodnej lub wręcz bezobjawowo [18].

W obecnej dobie zagrożenia atakami terrorystycznymi, nie można zapominać również o tym, że pałeczki *F. tularensis* mogą być użyte jako broń biologiczna w postaci aerozolu do wywołania atypowego zapalenia płuc [12, 14]

Tularemia została po raz pierwszy opisana w 1837 roku w Japonii. Nazwa choroby pochodzi od opisanej

w roku 1911 epidemii tularemii u wiewiórek w hrabstwie Tulare w Kalifornii a nazwa bakterii – od nazwiska badacza zajmującego się tymi drobnoustrojami – dr Edwarda Francis’a [46].

2. Czynniki etiologiczne

Tularemie wywołuje mała (0,2–0,7 μm), nieruchliwa, niezarodnikująca, barwiąca się biegunowo, rosnąca tlenowo Gram-ujemna ziarniako-pałeczka *Francisella tularensis*. Drobnoustrój ten jest wrażliwy na wysoką temperaturę, promienie słoneczne oraz na powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne. W tuszy zwierzęcej, w temperaturze do 21°C zarazek przeżywa kilka miesięcy. W zbiornikach wodnych bakterie przeżywają do 3 miesięcy, w mule – kilka tygodni; w wydzielinie z węzła chłonnego – miesiąc lub dłużej [41].

Pozycja taksonomiczna *F. tularensis* ulegała częstym zmianom. Pierwotnie drobnoustrój ten był zaliczany do rodzaju *Bacterium*, później do rodzaju *Pasteurella* lub *Brucella* [53], a od 1947 do nowo utworzonego rodzaju *Francisella* [16]. W *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* z 1984 r. w obrębie rodzaju *Francisella* obok *F. tularensis* znalazł się również drugi gatunek – *F. novicida*. Drobnoustroje należące do gatunku *F. novicida*, różnią się od *F. tularensis* niektórymi

właścivościami biochemicznymi oraz brakiem zjadliwosci dla ludzi i zwierząt. Obydwa drobnoustroje wykazują jednak wysoki stopień pokrewieństwa genetycznego (99,6% podobieństwo w sekwencji nukleotydów podjednostki 16S rDNA) i z tego powodu *F. novicida* uważana jest przez wielu badaczy za podgatunek *F. tularensis* i opisywana jako *F. tularensis* subsp. *novicida* [21, 34].

W 1989 r. Hollis i wsp. [34] zaproponowali aby do rodzaju *Francisella* włączyć pałeczki dotychczas klasyfikowane jako *Yersinia philomiragia*. Autorzy udowodnili, że skład kwasów tłuszczowych tych pałeczek jest typowy dla rodzaju *Francisella* a ich DNA wykazuje wysoki stopień pokrewieństwa do DNA *F. tularensis*. Nowy gatunek powinien zdaniem autorów przyjąć nazwę *F. philomiragia*.

Pierwotnie, w obrębie gatunku *F. tularensis* wyróżniano dwa podgatunki: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (inna nazwa typ A lub *F. tularensis* subsp. *nearctica*) oraz *F. tularensis* subsp. *palaeartica* (inna nazwa typ B lub *F. tularensis* subsp. *holarctica*), głównie na podstawie cech zjadliwosci tych drobnoustrojów, obecności ureidazy cytrulinowej i zdolności do produkcji kwasu z glicerolu [51, 52]. Bardziej szczegółowa analiza szczepów *F. tularensis*, podgrupy *holarctica*, wyróżnia 3 biovary: biovar I wrażliwy na erytromycynę, biovar II oporny na erytromycynę i biovar *japonica* [60].

Szczepy *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A) uważane są za najbardziej zjadliwe dla ludzi i domowych królików. Dawka zakażająca wynosi zaledwie 10 CFU a śmiertelność nie leczonej postaci skórnej wynosi 5–6% [17, 19, 52]. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A) są niemal wyłącznie izolowane na terenie Ameryki Północnej, chociaż ostatnio opisano przypadki izolowania tych szczepów na terenie Europy [29]. Zakażenia *F. tularensis* subsp. *palaeartica* (typ B) występują głównie u gryzoni wodnych takich jak bobry i pizmowce w północnych rejonach Ameryki Północnej a także u zajęcy i małych gryzoni w północnych rejonach Europy i Azji. *F. tularensis* subsp. *palaeartica* (typ B) są mniej wirulentne dla ludzi i królików.

Czwarta opisana w 1992 r. podgrupa tych drobnoustrojów, *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* występuje na terenie centralnej Azji i byłych republik Związku Radzieckiego. Szczepy te wykazują obecność ureidazy cytrulinowej i są zdolne do fermentacji glicerolu, ale są mniej zjadliwe dla królików od szczepów *F. tularensis* subsp. *tularensis* [18].

Budowa genomu pałeczek *F. tularensis* jest słabo poznana. W szczepie szczepionkowym (LVS) opisano występowanie dwóch różnych plazmidów kryptycznych (pOM1 i pNFL10) [54]. Aktualnie w różnych ośrodkach naukowych w Europie i USA trwają prace nad poznaniem sekwencji nukleotydów w genomie szczepu Schu S4 uważanego za typowego przedsta-

wiciela gatunku *F. tularensis* subsp. *tularensis* [18, 55]. Wstępne wyniki sugerują, że szczep Schu S4 posiada jeden z najmniejszych genomów spośród wszystkich bakterii, o wielkości poniżej 2 Mbp. Zawartość G + C w genomie wynosi około 34% [55].

3. Patogeneza zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*

F. tularensis może wniknąć do organizmu człowieka poprzez uszkodzoną skórę, błony śluzowe, układ pokarmowy i płuca [6, 14, 17, 18, 25]. W typowej postaci wrzodząco-węzłowej tularemii zmiany skórne pojawiają się w miejscu zakażenia po 3–5 dniach od ekspozycji [50]. Drobnoustroje te są względnie wewnątrzkomórkowymi patogenami, które zdolne są do namnażania wewnątrz makrofagów [1].

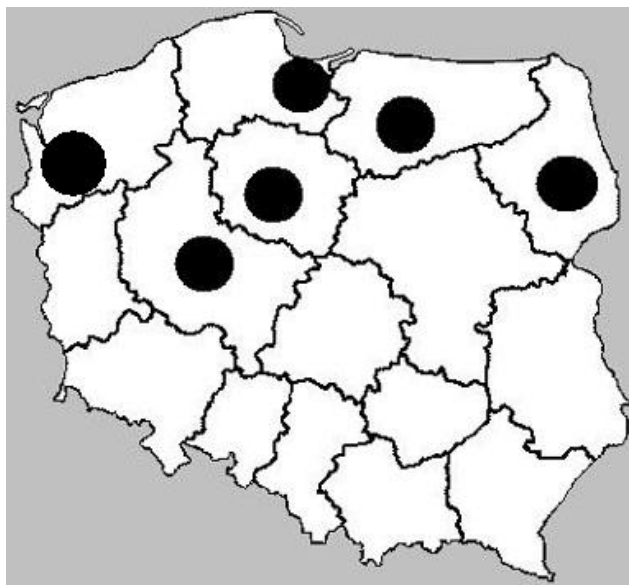
Po wstępnym 3–5-dniowym namnożeniu w miejscu zakażenia, bakterie drogą układu krwionośnego przedostają się do węzłów chłonnych, w których się dalej namnażają, a następnie są rozsiewane do takich narządów jak płuca, opłucna, śledziona, wątroba i nerki. W wątrobie bakterie namnażają się w hepatocytach, tam też jest produkowany nekrotyczny czynnik alfa, interleukina-10, interleukina-12 i gamma interferon (IFN- γ) [13, 27]. Początkową reakcją tkanek na zakażenie jest miejscowa martwica z naciekiem złożonym głównie z wielojądrowymi leukocytów a następnie z makrofagów, nabłonkowatych komórek i limfocytów. Zmiany wysiękowe stają się ziarniniakowate z centralnie umiejscowionymi zmianami martwiczymi, czasami ze strefą serowacenia otoczoną przez warstwę nabłonkowatych komórek, olbrzymich komórek wielojądrowych i fibroblastów. Zmiany te przybierają charakter typowy dla gruźlicy i sarkoidozy [13, 14, 62, 67, 74].

Zaobserwowano, że po podaniu małpom drogą aerogenną zjadliwego szczepu Schu S4 *F. tularensis* w ciągu 24 godzin pojawia się zapalenie oskrzeli [78], które przy braku leczenia rozszerza się następnie na płuca, w obrębie których tworzą się ziarniniaki i przewlekłe, śródmiąższowe zmiany włókniste.

U ludzi również bardzo szybko po zakażeniu dochodzi do krwotocznego zapalenia górnych dróg oddechowych oraz do zapalenia płuc. Histopatologiczne badanie skrawków płuc wykazuje przestrzenie wypełnione wysiękiem zawierającym monocyty [14].

4. Występowanie tularemii na świecie

Od 1911 roku, kiedy to, od gryzonia w Kalifornii wyizolowano, małą Gram-ujemną bakterię, którą nazwano *Bacterium tularensis* [46], naturalne zakażenia wywołane przez *F. tularensis* zostały opisane w wie-



Rys. 1. Występowanie endemicznych ognisk tularemii na terenie Polski

lu krajach półkuli północnej, najczęściej w Skandynawii, Północnej Ameryce, Japonii i Rosji [7, 9, 50, 69, 76]. Jednakże, ostatnio zanotowano przypadki tularemii w Turcji, Jugosławii, Hiszpanii i Szwajcarii [3, 18, 32, 59] co wskazuje, że choroba ta może występować w krajach o różnym klimacie.

W Polsce ogniska endemiczne tularemii występują głównie na północy kraju; w okolicach Szczecina, Olsztyna, Bydgoszczy, Gdańska, Białegostoku i Poznania [33, 41] (Rys. 1). W latach 1946–1971 zarejestrowano w Polsce 497 przypadków tularemii, głównie w okolicach Szczecina i Olsztyna. Natomiast w roku 1983 zanotowano w Polsce już tylko 4 przypadki zachorowań [2]. W 98% źródłem zakażenia ludzi były chore zające. Ogniska olsztyńskie powiązane są z obszarami endemicznymi na wschodnim wybrzeżu Bałtyku, gdzie duże epidemie tularemii obserwowano w latach 1943–1944 w okolicy Tylży oraz w okręgu Kaliningradzkim. Natomiast ogniska w rejonie Szczecina należą do największych endemicznych rejonów tularemii w Polsce [44].

Trzeba mieć na uwadze, że dostępne dane epidemiologiczne są mocno zaniżone z powodu braku charakterystycznych objawów klinicznych tularemii oraz niedostatecznym przygotowaniem laboratoriów do badań diagnostycznych w tym kierunku.

5. Objawy kliniczne

Tularemia u ludzi może przybierać różne formy, w zależności od drogi wniknięcia do organizmu. Pomimo że tularemia uważana jest za chorobę przebiegającą w ostrej postaci, w wielu przypadkach może przebiegać w formie łagodnej lub wręcz bezobjawowo [18].

Początek choroby jest nagły, z gwałtownymi dreszczami, bólem mięśni, głowy, uczuciem rozbicia, wysoką gorączką, osłabieniem, wymiotami, często obserwuje się zapalenie spojówek. Gorączka u osób nieleczonych ma charakter nawrotowy [20, 41, 50]. Pałeczki *F. tularensis* za pomocą makrofagów są transportowane do węzłów chłonnych, gdzie mogą się namnażać i następnie dalej rozprzestrzeniać po organizmie. Najczęściej w tej fazie choroby dochodzi również do bakteremii. Wstępny etap odpowiedzi immunologicznej charakteryzuje się ostrym stanem zapalnym. W późniejszej fazie tworzą się serowacenia ziarniniakowate podobne do tych występujących przy gruźlicy i sarkoidiozie. Okres wylegania choroby jest krótki, zwykle 3–5-dniowy chociaż może się wahać od 2 do 21 dni [13, 18, 67].

Wyróżnia się następujące postaci kliniczne tularemii [2, 6, 8, 14, 20, 25, 30, 41, 71]:

– **postać wrzodziejąco-węzłowa**: występuje w 45–85% wszystkich przypadków tularemii, najczęściej w wyniku kontaktu ze skażonymi tkankami zwierząt bądź w wyniku ukąszenia przez zakażone stawonogi, głównie kleszcze. Pojawiają się rumieniowate grudki w miejscu ukąszenia przez kleszcza. W ciągu 48 godzin zmiany się powiększają do 1–2 cm, przechodząc w krosty a następnie we wrzody, które mogą przetrwać przez wiele miesięcy. W późniejszym okresie pojawia się czarny strup z otaczającym go rumieniem i obrzękiem. Po okresie inkubacji, który typowo trwa od 3 do 6 dni u zakażonej osoby pojawiają się objawy grypopodobne, takie jak dreszcze, gorączka, ból głowy, ból mięśni. Drobnoustroje z miejsca wniknięcia rozsiewane są do węzłów chłonnych drogą układu chłonnego. Z powiększonych, czasami ropiejących węzłów chłonnych, bakterie mogą dostać się do okolicznych tkanek, takich jak śledziona, wątroba, płuca, nerki, jelita, centralny układ nerwowy, mięśnie szkieletowe. Występuje często leukocytoza oraz hiperbilirubinemia razem z podwyższonym poziomem wątrobowych transaminaz. Powrót do zdrowia może być opóźniony ale postać wrzodziejąco-węzłowa tularemii rzadko prowadzi do śmierci (poniżej 3% przypadków choroby), nawet przy braku leczenia.

W rzadkich przypadkach nie dochodzi do zmian skórnych w miejscu zakażenia a jedynie do powiększenia węzłów chłonnych. Taką postać określa się jako tularemię węzłową.

– **postać anginowa**: występuje rzadko, w mniej niż w 5% przypadków. Po spożyciu zakażonej *F. tularensis* wody lub żywności następuje wysiękowe zapalenie gardła i jamy ustnej z tendencją do owrzodzeń. Występuje gorączka, dreszcze, bóle mięśni oraz często dołącza się zapalenie płuc. Postać ta jest często określana jako bolesne owrzodzenie gardła z powiększeniem migdałków i tworzeniem się żółto-białych

blon rzekomych. Najczęściej objawom tym towarzyszy powiększenie węzłów chłonnych szyjnych.

– p o s t a ć ż o ł ą d k o w o - j e l i t o w a: spożycie zakażonej *F. tularensis* wody lub żywności może wywołać zapalenie żołądka i jelit. W zależności od dawki zakażającej, pokarmowa postać tularemii może przybierać formę łagodnej biegunki bądź też ostrej postaci pokarmowej z owrzodzeniami jelit.

– p o s t a ć p ł u c n a: występuje w poniżej 5% przypadków – jest to najbardziej ostro przebiegająca postać tularemii. Może ona być wywołana albo przez bezpośrednie wniknięcie drobnoustrojów drogą oddechową bądź też w wyniku powikłań innych postaci tularemii. Objawy występujące w postaci płucnej tularemii nie są swoiste i trudno je zróżnicować badaniem klinicznym czy też radiologicznym od innych chorób przebiegających z zapaleniem płuc. Objawy postaci płucnej tularemii to gorączka, bóle mięśni, ból głowy, ból w klatce piersiowej, suchy kaszel i zapalenie płuc. Może także dojść do zapalenia gardła. Choroba może przybrać formę ostrą (piorunującą) lub powolną, z objawami przedłużającymi się do wielu miesięcy. Obraz RTG wykazuje jedno- lub obustronne zapalenie płuc. Może wystąpić powiększenie węzłów chłonnych i wysięk w opłucnej. Czasami można zaobserwować nacieki w mięszu lub rozsiane zmiany ziarniniakowate a nawet ropnie w mięszu płuc. Występuje leukocytoza, podwyższenie poziomu transaminaz i bilirubiny oraz rozpad mięśni prądkowanych z podwyższonym poziomem fosfokinazy kreatyniny.

– p o s t a ć o c z n o - w ę z ł o w a: rzadko występująca postać kliniczna tularemii. Spojówki są pierwotnym miejscem wniknięcia bakterii, zazwyczaj w wyniku przeniesienia drobnoustrojów palcami. Na spojówkach pojawiają się owrzodzenia i guzki, a bakterie przenikają do okolicznych węzłów chłonnych.

– p o s t a ć d u r o w a: występuje rzadko, w mniej niż w 5% przypadków. Najczęstszym objawem jest gorączka bez pierwotnych zmian skórnych, węzłowych, ocznych oraz bez zmian zapalnych gardła i płuc. Początek choroby jest nagły, z gorączką 38–40° C, bólem mięśni, głowy i dreszczami. Może wystąpić biegunka i osłabienie. Pojawia się suchy kaszel z bólem zamostkowym. U 50–80% osób następuje wtórne zapalenie płuc z ropną płwociną i dusznością. Najczęstsze powikłania to rozpad mięśni prądkowanych, zapalenie wątroby, nerek, opon mózgowo-rdzeniowych i stawów. Śmiertelność sięga 50%.

6. Laboratoryjna diagnostyka zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*

Bakteriologiczna diagnostyka tularemii jest trudna i bardzo niebezpieczna dla personelu laboratoryjnego. Laboratoria o klasie bezpieczeństwa A przy podejrze-

niu w preparatach barwionych metodą Grama obecności pałeczek *F. tularensis* powinny przesłać szczep do laboratorium klasy B. Trzeba brać pod uwagę, że szereg innych drobnoustrojów, takich jak *Haemophilus* sp., *Acinetobacter* sp., *Actinobacillus* sp., *Bordetella* sp., *Pasteurella* sp., *Brucella* sp. może być mylonych z *F. tularensis*. Od osób podejrzanych o tularemię mogą być pobrane aspiraty z węzłów chłonnych, materiał ze zmian skórnych, próbki krwi, płwociny, moczu, materiał z przewodu pokarmowego, wymazy z gardła, wycinki z wątroby, śledziony, nerek, płuc oraz próbki szpiku kostnego [14, 18]. W skierowaniu do laboratorium powinno być ostrzeżenie o spodziewanym rozpoznaniu, co pozwoli na uniknięcie niebezpiecznych ekspozycji na ten wysoce zakaźny drobnoustrój. W próbkach surowicy należy poszukiwać przeciwciał różnymi metodami serologicznymi.

Najczęściej wykorzystywane metody laboratoryjnej diagnostyki zakażeń wywołanych przez *F. tularensis* przedstawiono w tabeli I.

7. Chemioterapia zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*

Ziarniako – pałeczki *F. tularensis* są generalnie wrażliwe na aminoglikozydy, teracykliny, fluorochinolony i chloramfenikol. Wszystkie szczepy produkują betalaktamazy rozkładające penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy (imipenem i meropenem). Są odporne na makrolidy i klindamycynę [14, 18, 41, 61].

Profilaktyczne podawanie antybiotyków jest efektywne jedynie wtedy, gdy rozpocznie się w ciągu 24 godzin po ekspozycji. Osoby które zetknęły się wcześniej z zakażonym materiałem powinny mierzyć temperaturę i przy pierwszych grypopodobnych objawach rozpocząć leczenie. Bliski kontakt z osobą chorą nie wymaga profilaktycznego podania antybiotyków. Ponieważ tularemia nie przenosi się z człowieka na człowieka nie jest konieczna izolacja chorych. Wystarczą standardowe środki ochronne personelu, takie jak rękawiczki przy kontakcie z krwią, ochronne okulary itp.

Antybiotyki stosowane w leczeniu tularemii zgodnie z zaleceniami specjalnej grupy naukowców, powołanej w USA pod nazwą Working Group on Civilian Biodefense, przedstawiono w tabeli II [14].

8. Szczepienia ochronne

Pierwsze żywe szczepionki dla ochrony osób narażonych na zakażenie *F. tularensis* były opracowane już przed II wojną światową w ówczesnym Związku Radzieckim. W pełni wirulentny szczep *F. tularensis* był atenuowany poprzez pasaż na sztucznych podłożach.

Tabela I

Metody laboratoryjnej diagnostyki zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*

Rodzaj badania	Metoda / pożywka	Uwagi
Preparaty mikroskopowe [14, 18, 45]	– Barwienie metodą Grama lub metodą May/Grunwald/Giemsy	Małe, Gram-ujemne, słabo wybarwione ziarniako-pałeczki na granicy widoczności
Preparaty histologiczne [18, 28, 48]	– odczyn immunofluorescencji bezpośredniej i pośredniej, – odczyn immunoenzymatyczny, – odczyn precypitacji w kapilarach, – odczyn immunochromatografii,	Wysokie czułe i swoiste metody pozwalające wykryć drobnoustroje w liczbie $>10^3$ CFU/ml, Wysoka swoistość odczynu przy niskiej czułości
Hodowla [11, 14, 18, 26, 28, 45, 56, 58, 73, 75, 77]	– agar z dodatkiem krwi, cysteiny i glukozy, – agar czekoladowy, – podłoże TSB lub bulion mózgowo-sercowy wzbogacony cysteiną, – bulion Mueller-Hinton z dodatkiem pirofosforanu żelazowego, – podłoże Chamberlaina	Okrągłe, gładkie, lekko śluzowe, zielonkawo-białe kolonie o średnicy 2–4 mm Wzrost na podłożach płynnych jest powolny, wymaga około 7–10 dni inkubacji. <i>F. tularensis</i> rośnie w postaci zwartego pierścienia blisko górnej krawędzi bulionu
Próba biologiczna [45]	Myszom lub świnkom morskim podaje się próbki materiału klinicznego drogą pokarmową, dootrzewnowo, podskórnie lub dożylnie	Padnięcia po 2–10 dniach. Krwotoczne powiększenie węzłów chłonnych, śledziony, wątroby, liczne ogniska martwicze
Metody biologii molekularnej [8, 15, 18, 21, 24, 28, 37–39, 57, 68]	– łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), – REP-PCR	Poszukuje się fragmentów genów kodujących białka błony zewnętrznej Pozwala na typowanie różnych podgatunków szczepów <i>F. tularensis</i>
Badania serologiczne [4, 5, 10, 14, 18, 42, 45, 66, 72, 79]	– odczyn mikroaglutynacji – odczyn aglutynacji probówkowej – odczyn lateksowy – odczyn ELISA – odczyn western-immunoblotting	Przeciwciała dla antygenów <i>F. tularensis</i> pojawiają się w surowicy osób chorych po 10–14 dniach od wystąpienia objawów klinicznych, osiągają najwyższy poziom w 4–7 tygodniu choroby

Tabela II

Antybiotyki stosowane w leczeniu tularemii zgodnie z zaleceniami Working Group on Civilian Biodefense [14]

Grupa osób	Antybiotyk z wyboru	Antybiotyk alternatywny
Osoby dorosłe	Streptomycyna: 1 g domięśniowo, 2 × dziennie, przez 10 dni	Doksycyklina: 100 mg dożylnie, 2 × dziennie, przez 14–21 dni
	Gentamycyna: 5 mg/kg domięśniowo lub dożylnie 1 × dziennie, przez 10 dni	Chloramfenikol: 15 mg/kg dożylnie, 4 × dziennie, przez 14–21 dni
		Ciprofloksacyna: 400 mg dożylnie, 2 × dziennie, przez 10 dni
Dzieci	Streptomycyna: 15 mg/kg domięśniowo, 2 × dziennie, Gentamycyna: 2,5 mg/kg domięśniowo lub dożylnie 3 × dziennie	Doksycyklina: u dzieci o wadze ≥ 45 kg, 100 mg dożylnie 2 × dziennie u dzieci o wadze < 45 kg 2,2 mg/kg dożylnie, 2 × dziennie
		Chloramfenikol: 15 mg/kg dożylnie 4 × dziennie
		Ciprofloksacyna: 15 mg/kg dożylnie, 2 × dziennie

zach z dodatkiem surowicy odpornościowej lub też poprzez jego suszenie. Z początkiem lat 40-tych ubiegłego wieku po stracie początkowo używanego w pełni wirulentnego szczepu *F. tularensis* wyizolowano nowy szczep oznaczony jako „15”, który posiadał zredukowane właściwości wirulentne dla świnek morskich przy w pełni zachowanej wirulencji dla myszy. Do roku 1960 atenuowany szczep 15 *F. tularensis*, poda-

wany podskórnie, użyto do zaszczepienia 60 milionów osób [67]. Późniejszym wariantem szczepu „15”, który z czasem utracił swoje właściwości wirulentne dla myszy był tzw. szczep „15 – odnowiony” (15 restored). Innym szczepem uzyskanym w Instytucie im. Gamalei w Moskwie był szczep oznaczony jako „155” [63]. Obydwa te szczepy dawały 2 typy kolonii, oznaczone jako wariant niebieski lub szary, w zależności od koloru

jaki przyjmowały kolonie oglądane pod mikroskopem przy bocznym oświetleniu. Drobnoustroje pochodzące z wariantu niebieskiego okazały się bardziej zjadliwe i immunogenne niż pochodzące z wariantu szarego [17]. Posłużyły one do przygotowania żywego szczepu szczepionkowego – LVS (live vaccine strain) *F. tularensis*, który zapewniał efektywną ochronę immunizowanych tym szczepem myszy i świnek morskich przed zakażeniem drogą oddechową wirulentnym szczepem Schu S4 *F. tularensis*. Badania przeprowadzone na ochotnikach u ludzi potwierdziły, że użycie szczepionki przygotowanej ze szczepu LVS zapewnia istotną ochronę przed zakażeniem *F. tularensis* drogą oddechową [64, 65]. Szczepionkę ze szczepu LVS można podawać zarówno drogą aerogenną, pokarmową jak i podskórną. Produkcję tej szczepionki rozpoczęto w USA w 1959 roku. Po jej zastosowaniu częstość zakażeń *F. tularensis* wywołujących postać durową spadła z 5,7 do 0,27 przypadków na 1000 przypadków wysokiego ryzyka. Szczepionka LVS jest jak dotąd jedyną skuteczną szczepionką w zapobieganiu tularemii. Nie jest ona jednak obecnie ogólnie dostępna ponieważ nadal trwają prace nad dopuszczeniem jej do obrotu.

Pierwsze prace nad zabitą szczepionką były prowadzone w 1930 roku przez Lee F o s h a y [22, 23]. Stosowano różne metody inaktywacji żywego szczepu, takie jak ogrzewanie, działanie acetonem i fenolem. Skuteczność tego typu szczepionki obecnie jest kwestionowana. Stwierdzono, że stymuluje ona głównie odporność humoralną a bardzo słabo odporność komórkową. Wiadomo jest natomiast, że skuteczną ochronę przed wystąpieniem tularemii zapewnia odporność komórkowa związana z limfocytami T [74]. Dodatkową ujemną cechą tej szczepionki było stymulowanie występowania lokalnych reakcji poszczepiennych.

Prowadzone są także prace nad stworzeniem tzw. szczepionki podjednostkowej zawierającej w swoim składzie poszczególne antygeny występujące w komórce *F. tularensis*, które są zdolne indukować odporność humoralną i komórkową. Do tej pory udało się zidentyfikować 23 takie antygeny. Stwierdzono, że niektóre z białek otoczkowych, o masie 61, 40, 37, 32 i 17,5 – kda stymulowały także odpowiedź komórkową [35, 62, 70].

9. Tularemia jako broń biologiczna

Prace nad wykorzystaniem pałeczek *F. tularensis* jako broni biologicznej były prowadzone w USA, ZSRR i Japonii już przed II wojną światową [14]. Istnieje podejrzenie, że bakterie te mogły być użyte przez Rosjan w latach 1942–43 w czasie walk o Stalingrad podczas II wojny światowej [14]. U żołnierzy po obydwu stronach frontu walczących wojsk oraz wśród ludności cywilnej wystąpiły wtedy masowe zachorowania na zapalenie płuc. *F. tularensis* była też jednym z drobnoustrojów testowanych jako broń biologiczna przez Japonię w latach 1932–1945 podczas walk w Mandżurii. Po II wojnie światowej prace nad bronią biologiczną były kontynuowane zarówno w USA jak i ZSRR. W USA prace te trwały do końca lat 60-tych, W roku 1973 wszystkie zapasy *F. tularensis* zostały zniszczone [12]. W Związku Radzieckim a potem w Rosji prace nad użyciem pałeczek tularemii jako broni biologicznej trwały do roku 1990 [14]. Uzyskano nawet warianty odporne na antybiotyki.

WHO ustaliło, że 50 kg zawiesiny *F. tularensis* rozsianej w postaci aerozolu nad dużym miastem spowoduje zachorowanie 250 tysięcy osób i śmierć 19 tysięcy [31]. Zachorowania występowałyby przez wiele tygodni a nawroty choroby zdarzałyby się jeszcze przez wiele miesięcy. Osoby zaszczepione byłyby tylko częściowo odporne na zakażenie drogą oddechową. Finansowe konsekwencje potencjalnego ataku bioterrorystycznego przy użyciu pałeczek *F. tularensis* według WHO wyniosłyby ponad 5 miliardów dolarów na każde 100 tysięcy osób bezpośrednio narażonych na zakażenie [40].

Według The Working Group on Civilian Biodefense, biologiczny atak przy użyciu *F. tularensis* charakteryzowałby się następującymi cechami:

- nagłym pojawieniem się u wielu osób ostrych objawów gorączki z atypowym zapaleniem płuc,
- pojawieniem się objawów skórnych, powiększenie węzłów chłonnych, zapalenie gardła,
- pojawieniem się ostrych objawów płucnych u pierwotnie zdrowych, młodych osób,
- wystąpieniem przypadków tularemii na terenach miejskich,

Tabela III

Zalecenia Working Group on Civilian Biodefense dotyczące leczenia tularemii w przypadku masowego ataku terrorystycznego [14]

Grupa osób	Antybiotyki
Osoby dorosłe	Doksycyklina: 100 mg doustnie, 2 × dziennie, przez 2 tygodnie Ciprofloksacyna: 500 mg doustnie, 2 × dziennie, przez 2 tygodnie
Dzieci	Doksycyklina: u dzieci o wadze ≥45 kg, 100 mg doustnie, 2 × dziennie, przez 2 tygodnie u dzieci o wadze < 45 kg, 2,2 mg/kg doustnie, 2 × dziennie, przez 2 tygodnie Ciprofloksacyna: 15 mg/kg doustnie, 2 × dziennie

- brakiem wektorów zwierzęcych, w tym gryzoni, przy zachorowaniach wśród zakażonych osób brak różnicowania co do płci i ich wieku,
- w preparatach próbek materiału klinicznego i hodowli barwionych metodą Grama widocznymi, małymi, Gram-ujemnymi pałeczek-ziarniakami.

W przypadku wystąpienia masowych zachorowań z objawami atypowego zapalenia płuc należy różnicować tularemie od innych jednostek chorobowych, które mogą wystąpić po ewentualnym ataku bioterrorystycznym, takich jak wąglik, dżuma czy gorączka Q.

Zalecenia Working Group on Civilian Biodefense dotyczące leczenia tularemii w przypadku masowego ataku terrorystycznego przedstawiono w tabeli III [14].

10. Podsumowanie

W pracy przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące tularemii – choroby zakaźnej, która sama w sobie nie stanowi obecnie poważnego problemu epidemiologicznego. Ostatni wzrost zainteresowania tą chorobą wiąże się z potencjalnym zagrożeniem atakiem terrorystycznym przy wykorzystaniu pałeczek *F. tularensis* jako broni biologicznej.

Autorzy uznali, że zebranie, w oparciu o najnowsze piśmiennictwo, w krótkim artykule najważniejszych wiadomości dotyczących czynnika etiologicznego tularemii, patogenezы zakażeń wywołanych przez *F. tularensis*, objawów klinicznych choroby, jej diagnostyki i chemioterapii zakażeń będzie stanowić istotne kompendium wiedzy niezbędne każdemu mikrobiologowi, któremu przyjdzie zajmować się diagnostyką zakażeń wywołanych przez pałeczki *F. tularensis*.

Piśmiennictwo

1. Anthony L.S.D., Burke R.D., Nano F.E.: Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages. *Infect. Immun.* **59**, 3291–3296 (1991)
2. Anusz Z.: Brucelozą i inne choroby odzwierzęce – 1983. *Przegl. Epidemiol.* **39**, 157–165 (1985)
3. Bachiller Luque P., Perez Castrillon J.L., Martin Luquero M., Mena Marlin F.J., J. de la Lama Lopez-Areal J., Perez Pascual P., Mazon M.A., Herreros Guilarte V.: Preliminary report of an epidemic tularemia outbreak in Valladolid. *Rev. Clin. Esp.* **198**, 789–793 (1998)
4. Bevanger L., Maeland J.A., Naess A.I.: Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 433–437 (1988)
5. Bevanger L., Maeland J.A., Naess A.I.: Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43,000 – molecular-weight *Francisella tularensis* outer membrane protein for the diagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 922–926 (1989)
6. Bell J.F.: Tularemia – a review. W: Zoonoses. CRC Handbook Series, Sect. A, CRC Press, Boca Raton, Fla. 1977
7. Berdal B.P., Mehl R., Meidell N.K., Lorentzen-Styr A.M., Scheel O.: Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 191–195 (1996)
8. Berdal B.P., Mehl R., Haaheim H., Loksa M., Grunow R., Burans J., Morgan C., Meyer H.: Field detection of *Francisella tularensis*. *Scand. J. Infect. Dis.* **32**, 287–29 (2000)
9. Boyce J.M.: Recent trends in the epidemiology of tularemia in the United States. *J. Infect. Dis.* **131**, 197–199 (1975)
10. Carlsson H.E., Lindberg A.A., Lindberg G., Hederstedt B., Karlsson K.A., Agell H.O.: Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 615–621 (1979)
11. Chamberlain R.E.: Evaluation of a live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* **13**, 232–235 (1965)
12. Christopher G.W., Cieslak T.J., Pavlin J.A., Eitzen E.M.: Biological warfare: a historical perspective. *JAMA*, **278**, 412–417 (1997)
13. Conlan J.W., North R.J.: Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.* **60**, 5164–5171 (1992)
14. Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Friedlander A.M., Hauer J., Layton M., Lillibridge S.R., McDade J.E., Osterholm M.T., O’Toole T., Parker G., Perl A.M., Russell P.K., Tonat K.: Tularemia as a biological weapon – medical and public health management. *JAMA*, **285**, 2763–2773 (2001)
15. Dolan S.A., Dommaraju C.B., DeGuzman G.B.: Detection of *Francisella tularensis* in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 764–765 (1998)
16. Dorofe’v K.A.: Classification of the causative agent of tularemia. *Symp. Res. Works Inst. Epidemiol. Mikrobiol. Chita*. **1**, 170–180 (1947)
17. Eigelsbach H.T., Downs C.M.: Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. 1. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J. Immunol.* **87**, 415–425 (1961)
18. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W.: Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 631–646 (2002)
19. Evans M.E.: *Francisella tularensis*. *Infect. Control.* **6**, 381–383 (1925)
20. Evans M.E., Gregory D.W., Schaffner W., McGee Z.A.: Tularemia: a 30 year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)*, **64**, 251–269 (1985)
21. Forsman M., Sandstrom G., Sjostedt A.: Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 38–46 (1994)
22. Foshay L., Hesselbrock W.H., Wittenberg H.J., Rodenberg A.H.: Vaccine prophylaxis against tularemia in man. *Am. J. Public Health*, **32**, 1131–1145 (1942)
23. Foshay L.: A comparative study of the treatment of tularemia with immune serum, hyperimmune serum and streptomycin. *Am. J. Med.* **1**, 180–188 (1946)
24. Fulop M., Leslie D., Titball R.: A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **54**, 364–366 (1996)
25. Gill V., Cunha B.A.: Tularemia pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* **12**, 61–67 (1997)

26. Gilligan, P.H.: *Pseudomonas* and *Burkholderia*. W: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H. (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, 1995, str. 509–519
27. Golovliov I., Sandstrom G., Ericsson M., Sjostedt A., Tarnvik A.: Cytokine expression in the liver during the early phase of murine tularemia. *Infect. Immun.* **63**, 534–538 (1995)
28. Grunow R., Spletstoeser W., McDonald S., Otterbein C., O'Brien T., Morgan C., Aldrich J., Hoffer E., Finke E., Meyer H.: Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**, 86–90 (2000)
29. Gurycova D.: First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidemiol.* **14**, 797–802 (1998)
30. Haristoy X., Lozniewski A., Tram C., Simeon D., Bevanger L., Lion C.: *Francisella tularensis* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2774–2776 (2003)
31. Health Aspects of Chemical and Biological Weapons. Geneva, Switzerland: WHO, 1970, str. 105–107
32. Helvacı S., Gedikoglu S., Akalin H., Oral H.B.: Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur. J. Epidemiol.* **16**, 271–276 (2000)
33. Hermanowska-Szpakowicz T., Pancewicz S.A.: Obecność przeciwciał przeciw *Francisella tularensis* u osób zamieszkujących północno-wschodnią Polskę. *Przegl. Epidemiol.* **50**, 55–59 (1996)
34. Hollis, D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G., Wenger J.D., Moss C.W., Brenner D.J.: *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1601–1608 (1989)
35. Holm S.E., Tarnvik A., Sandstrom G.: Antigenic composition of a vaccine strain of *Francisella tularensis*, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **61**, 136–144 (1980)
36. Hubalek Z., Sixl W., Halouzka J.: *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic and Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* **110**, 909–910 (1998)
37. Ibrahim A., Gerner-Smidt P., Sjostedt A.: Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2894–2896 (1996)
38. Junhui Z., Ruifu Y., Jianchun L., Songle Z., Meiling C., Fengxiang C., Hong C.: Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* **45**, 477–482 (1996)
39. Karhukorpi E.K., Karhukorpi J.: Rapid laboratory diagnosis of ulceroglandular tularemia with polymerase chain reaction. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**, 383–385 (2001)
40. Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and post-attack intervention programs justifiable? *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 83–94 (1997)
41. Knap J. Tularemia. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A. α -medica press, Bielsko-Biała, s. 288–293 (2004)
42. Koskela P., Salminen A.: Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 973–979 (1985)
43. Łapiński T.W., Mięgoć H., Prokopowicz D., Kowalczyk-Vot A.: Zagrożenia toksokarozą i tularemią pracowników Białowieskiego Parku Narodowego. *Przegl. Epidemiol.* **54**, 367–374 (2000)
44. Malottke R., Dominowska C.: Zachorowania na tularemię w Polsce w latach 1946–1971. *Przegl. Epidemiol.* **27**, 59–67 (1973)
45. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th edition, 2000
46. McCoy G.W., Chapin C.W.: Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularensis*. *J. Infect. Dis.* **10**, 61–72 (1912)
47. McCrumb F.R.: Aerosol infection of man with *Pasteurella tularensis*. *Bacteriol. Rev.* **25**, 262–267 (1961)
48. Morner T.: The use of FA technique of detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. *Acta Vet. Scand.* **22**, 296–306 (1981)
49. Morner T.: The ecology of tularemia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **11**, 1123–1130 (1992)
50. Ohara Y., Sato T., Fujita H., Ueno T., Homma M.: Clinical manifestations of tularemia in Japan – analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987. *Infection*, **19**, 14–17 (1991)
51. Olsufjev N.G., Emelyanova O.S., Dunaeva T.N.: Comparative study of strains of *B. tularensis* in the Old and New World and their taxonomy. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **3**, 138–149 (1959)
52. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S.: Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 872–874 (1983)
53. Owen C.R.: Genus *Francisella*, W: Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. 1974, s. 283–285
54. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K.: Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: the base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 253–256 (1996)
55. Prior R.G., Klasson L., Larsson P., Williams K., Lindler L., Sjostedt A., Svensson T., Tamas I., Wren B.W., Oyston P.C.F., Andersson S.G.E., Titball R.W.: Preliminary analysis and annotation of the partial genome sequence of *Francisella tularensis* strain Schu 4. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 1–7 (2001)
56. Provenza J.M., Klotz S.A., Penn R.L.: Isolation of *Francisella tularensis* from blood. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 453–455 (1986)
57. Puente-Redondo V.A. de la, Garcia del Blanco N., Gutierrez-Martin C.B., Garcia-Pena F.J., Rodriguez Ferri E.F.: Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strain. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1016–1022 (2000)
58. Reary B.W., Klotz S.A.: Enhancing recovery of *Francisella tularensis* from blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 117–119 (1988)
59. Reintjes R., Dedushaj I., Gjini A., Jorgensen T.R., Cotter B., Lieftucht A., D'Ancona F., Dennis D.T., Kosoy M.A., Mulliqi-Osmani G., Grunow R., Kalaveshi A., Gashi L., Humolli L.: Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 69–73 (2002)
60. Rodionova I.V.: Respiration of geographic variants of *Francisella tularensis* in the presence of glycerin. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **44**, 21–25 (1967)
61. Russell P., Eley S.M., Fulop M.J., Bell D.L., Titball R.W.: The efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental tularemia. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 461–465 (1998)

62. Sandstrom G., Tarnvik A.: Immunospecific T-lymphocyte stimulation by membrane proteins from *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 641–644 (1987)
63. Sandstrom G.: The tularemia vaccine. *J. Chem. Tech. Biotech.* **59**, 315–320 (1994)
64. Saslaw S., Eigelsbach H.T., Prior J.A., Wilson H.E., Carhart S.: Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Arch. Intern. Med.* **107**, 702–714 (1961)
65. Saslaw S., Eigelsbach H.T., Wilson H.E., Prior J.A., Carhart S.: Tularemia vaccine study. I Intracutaneous challenge. *Arch. Intern. Med.* **107**, 689–701 (1961)
66. Sato T., Fujita H., Ohara Y., Homma M.: Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2372–2374 (1990)
67. Sjostedt A., Tarnvik A., Sandstrom G.: *Francisella tularensis*: host-parasite interaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 181–184 (1996)
68. Sjostedt A., Eriksson U., Berglund L., Tarnvik A.: Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1045–1048 (1997)
69. Stewart S.J.: Tularemia: association with hunting and farming. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 197–199 (1996)
70. Surcel H.M., Sarvas M., Helander I.M., Herva E.: Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals. *Microb. Pathog.* **7**, 411–419 (1989)
71. Syrjala H., Kujala P., Myllyla V., Salminen A.: Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand. J. Infect. Dis.* **17**, 371–375 (1985)
72. Syrjala H., Koskela P., Ripatti T., Salminen A., Herva E.: Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical severities of the disease. *J. Infect. Dis.* **153**, 142–145 (1986)
73. Tarnvik A., Lofgren S., Ohlund L., Sandstrom G.: Detection of antigen in urine of a patient with tularemia. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**, 318–319 (1987)
74. Tarnvik A.: Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. *Rev. Infect. Dis.* **11**, 440–451 (1989)
75. Tarnvik A., Henning C., Falsen E., Sandstrom G.: Isolation of *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* from human blood. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**, 146–150 (1989)
76. Tarnvik A., Sandstrom G., Sjostedt A.: Epidemiological analysis of tularemia in Sweden, 1931–1993. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 201–204 (1996)
77. Westerman K.L., McDonald J.: Tularemia pneumonia mimicking Legionnaires' disease: isolation of organism on CYE agar and successful treatment with erythromycin. *South. Med. J.* **76**, 1169–1170 (1983)
78. White J.D., Rooney J.R., Prickett P.A., Derrenbacher E.H., Beard C.W., Griffith W.R.: Pathogenesis of experimental respiratory tularemia in monkeys. *J. Infect. Dis.* **114**, 277–283 (1964)
79. Viljanen M.K., Nurmi T., Salminen A.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen for IgM, IgA, and IgG antibodies to *Francisella tularensis*: comparison with bacterial agglutination test and ELISA with lipopolysaccharide antigen. *J. Infect. Dis.* **148**, 715–720 (1983)

Maciej Walczak¹, Wojciech Donderski²

¹Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Ekologii i Ochrony Środowiska,
Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii,
ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, e-mail: walczak@biol.uni.torun.pl, tel. (056) 611 44 33

²Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Ekologii i Ochrony Środowiska,
Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii,
ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń, e-mail: wojdon@biol.uni.torun.pl, tel. (056) 611 45 71

Wpłynęło w marcu 2005

1. Wprowadzenie. 2. Budowa mikrowarstwy powierzchniowej. 3. Czynniki determinujące przeżywalność i aktywność bakterieuston. 4. Bakterieuston. 5. Podsumowanie

Bacterioneuston of water bodies

Abstract: The zone of contact between water makes air and the organic layer that is formed on the surface of water and constitutes a unique habitat for microorganisms. Increased number of bacteria called bacterioneuston is observed there. This organic layer is defined as the surface microlayer, surface film or air-water interface. Adhesive forces acting as a result of intermolecular attraction at the border of two phase centres-water and air-contribute to the existence of a surface membrane. That layer makes a very stable environment for microorganisms as concerns nutrients abundance. On the other hand, due to high temperatures, sunlight radiation and presence of toxic substances it is not very favourable for their growth and development as compared to the depth of water. All the above mentioned factors are selective and affect the microbiological composition of this environment. Biochemical activity of bacteria living in the surface microlayer is lower than that of bacteria coming from deeper water layers. In spite of this, the concentration of ATP as an index of biomass and biochemical activity is higher in the surface membrane. Identification of bacteria strains isolated from the surface biofilm reveal that most of them represented the genera *Bacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio-Aeromonas* group and the *Enterobacteriaceae* family. Probably in surface microlayer water also exist very specialized bacteria, capable of taking advantage of prevailing here conditions (high temperature, abundance of nutritional substances) and actively carrying out metabolic transformations.

1. Introduction. 2. Surface microlayer structure. 3. Factors determinated survival and activity of bacterioneuston. 4. Bacterioneuston. 5. Conclusion

Słowa kluczowe: bakterieuston, mikrowarstwa powierzchniowa, środowiska ekstremalne

Key words: bacterioneuston, surface microlayer, extreme environments

1. Wprowadzenie

Zbiorniki wodne tak śródlądowe jak i morskie nie są środowiskiem jednorodnym. W ich obrębie można wyróżnić wyraźne strefy zarówno w płaszczyźnie poziomej jak i pionowej. W płaszczyźnie pionowej zewnętrzną warstwą jest tak zwana błona powierzchniowa, zwana też filmem powierzchniowym, bio-filmem lub interfazą woda–powietrze. Pierwsze doniesienia o istnieniu filmu powierzchniowego zbiorników wodnych pojawiły się w 1773 roku. W listach z podróży morskiej Benjamin Franklin informował o tym niezwykłym zjawisku naukowców amerykańskich [30].

Henry David Thoreau jako pierwszy opisał w 1858 roku swoje obserwacje dotyczące filmu powierzchniowego. Badacz ten zauważył, że jeśli na powierzchni morza obecne są substancje organiczne, zmarszczki pojawiające się w początkowej fazie generacji fal, zostają wygładzone [60].

Błona powierzchniowa pokrywa $\frac{3}{4}$ powierzchni świata a jednocześnie obejmuje nieskończenie małą objętość całości masy wód, zgromadzonej na Ziemi. MacIntyre [53] nazwał ją najważniejszym milimetrem oceanu.

Błona powierzchniowa zbiorników wodnych jest szczególnym środowiskiem chemicznym i fizycznym, zupełnie różnym od wody podpowierzchniowej. Do jej występowania przyczyniają się siły adhezji, działające na skutek przyciągania międzycząsteczkowego i napięcia powierzchniowego na granicy dwóch ośrodków: wody i powietrza. Prowadzi to do akumulacji w tej warstwie związków organicznych i nieorganicznych. W warstwie tej obserwuje się zwykle podwyższoną liczebność bakterii, zwanych bakterieustonem. Bakterieuston zarówno konsumuje jak i produkuje substancje organiczne, przyczyniając się do tworzenia mikrowarstwy powierzchniowej, stanowiącej ekstremalnie zewnętrzną część błony powierzchniowej. Biofilm powierzchniowy wraz z zasiedlającym go

bakterioneustonem, pełni rolę filtra oddzielającego środowisko wodne od atmosfery.

Działające na powierzchni zbiorników wodnych siły napięcia powierzchniowego powodują fizyczną stabilność tej warstwy. Z drugiej strony, ze względu na ekstremalne wartości temperatury, czy dawki energii słonecznej, jest to wysoce niestabilne środowisko w porównaniu z wodą podpowierzchniową.

2. Budowa mikrowarstwy powierzchniowej

Modele struktury mikrowarstwy opierają się na obecności w niej pewnych dużych organicznych komponentów znalezionych w jej przestrzeni, m.in. takich jak białka, polisacharydy, lipidy czy substancje humusowe. Ta organiczna warstwa, zgodnie z definicją użytą przez Garrett'a [29] i Norkrans [68] jest określana jako powierzchniowa mikrowarstwa. Początkowy jej model zaproponowany przez Norkrans [68] grupował występujące w niej komponenty organiczne w dwie warstwy (Rys. 1a):

1. suchą, zawierającą lipidy,
2. moką, leżącą poniżej, zawierającą białka i cukrowce,
 - w obrębie tej warstwy jak i pod nią miał występować bakterioneuston

Zgodnie z tym schematem warstwa lipidowa stanowi jedynie pierwszych kilka nanometrów grubości [49]. W przypadku, jeżeli film lipidowy jest zbudowany tylko z jednej warstwy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, osiąga on grubość zaledwie 1–2 nm. Jednak najczęściej film ten dochodzi do 10 nm grubości i zbudowany jest z kilku warstw łańcuchów lipidowych, nakładających się na siebie i stanowiących rzeczywistą mikrowarstwę powierzchniową. Większość związków akumulujących się w tej błonie, jest aktywna powierzchniowo lub absorbuje się na substancjach tego typu. Ze względu na polarną budowę tworzą one uporządkowaną warstwę błony na granicy rozdziału powietrze–woda [68]. Pod względem chemicznym film lipidowy zwany też lipidową mikrowarstwą powierzchniową, składa się głównie z parzystej liczby wolnych kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych, z łańcuchami o 12–22 atomach węgla [68]. Jednym z częściej występujących jest kwas palmitynowy (C 16), dominują jednak kwasy C 15 i C 17, sugerując częściowe pochodzenie bakteryjne [29]. Oprócz wolnych kwasów tłuszczowych spotyka się w niej glicerydy [49], a wśród nich trójglicerydy.

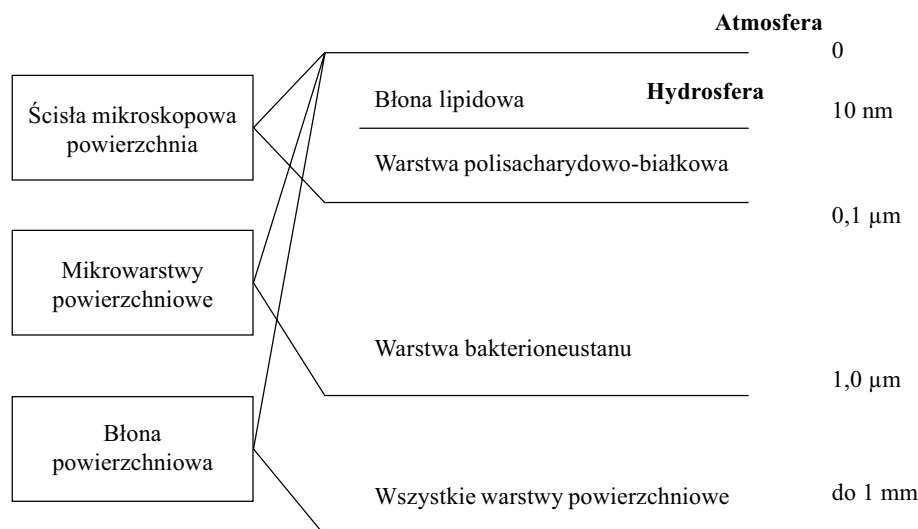
Niżej położona mikrowarstwa kompleksów polisacharydowo-proteinowych wg Baier i wsp. [2] ma grubość 10–30 nm. Ten sam autor [1] stwierdził, że błona powierzchniowa zarówno wód morskich jak i śródlądowych jest przesycona glikoproteinami i proteoglikanami. Według niego związki te stanowią jedne z najważniejszych składników budujących biofilm. Na-

stępnie stwierdzono, że mono- i polisacharydy stanowią średnio 28 % całej rozpuszczonej materii organicznej występującej w błonie powierzchniowej [77]. Późniejsze badania [58] potwierdzały wagę występujących w biofilmie substancji o charakterze cukrowców. Według Marty'ego i wsp. [58] znaczna część materii organicznej budującej błonę powierzchniową to węglowodany – do 80 %, przy czym część z nich wykazuje charakter polisacharydów typu dekstran. Natomiast Sieburt i wsp. [77], powierzchniowy film lipidowy łącznie z polisacharydowo-proteinową warstwą, nazywają mikrowarstwą powierzchniową o grubości 100 nm (0,1 μm), w której średnie stężenie węglowodanów wynosi 875 mg/dm^3 . W warstwie tej występują tzw. „mokra” substancje powierzchniowo czynne, tworząc bardziej nieregularną strukturę. Pod względem stosunku do wody są one hydrofilowe, a w błonie powierzchniowej układają się dzięki obecności w ich strukturze niewielu łańcuchów hydrofobowych [68].

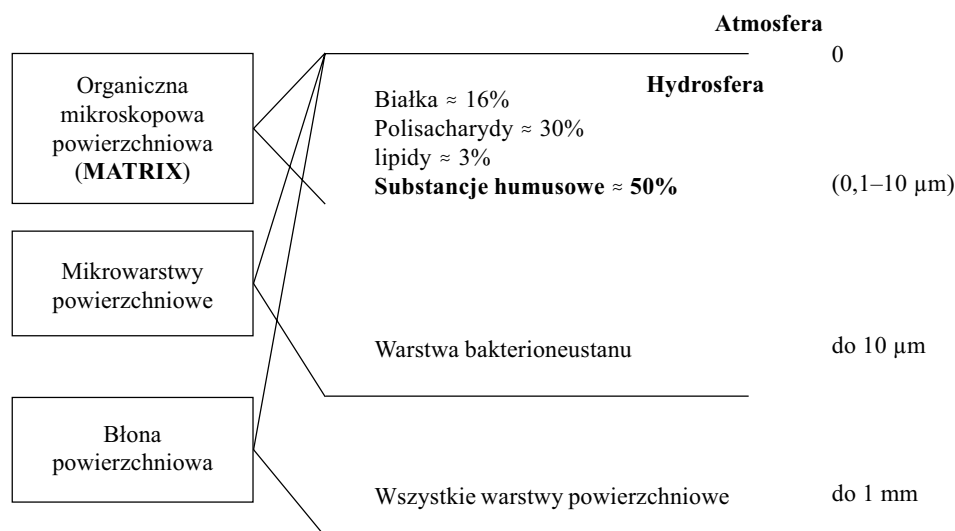
Opisywany model struktury błony powierzchniowej przewidywał, że pod warstwą lipidów i warstwą zbudowaną z mieszaniny białek oraz mono- i polisacharydów, występuje tak zwany bakterioneuston. Błona ta stanowi warstwę gdzie następuje szczególne nagromadzenie komórek bakteryjnych. Bakterie zasiedlające błonę powierzchniową stanowią najważniejszy biologicznie składnik neuston [54]. Warstwa bakterioneuston została wyróżniana przez wielu badaczy [43, 59, 68] a jej grubość określa się na 1 do 50 mm. We wszystkich tych pracach zwracano uwagę na wyższą liczebność bakterii w mikrowarstwie powierzchniowej w stosunku do wody podpowierzchniowej. Ponadto istnienie silnej współzależności pomiędzy filmem a bakteriami, polegającej na tym, że bakterioneuston zarówno konsumuje jak i produkuje substancje organiczne, przyczyniając się do tworzenia mikrowarstwy powierzchniowej, umożliwia wysoką akumulację bakterii w biofilmie.

Według alternatywnego modelu, poszczególne rodzaje substancji chemicznych budujących błonę powierzchniową miałyby być te same (z wyjątkiem substancji humusowych). Natomiast ich wzajemny udział a zwłaszcza rozmieszczenie przedstawia się zupełnie inaczej. Model ten (Rys. 1b) proponuje podstawę z białek, lipidów i polisacharydów, wymieszanych razem i tworzących zhydratowaną, żelopodobną matriks, w połączeniu z substancjami humusowymi [78]. Warto zwrócić uwagę, że substancje humusowe według tego modelu stanowią do 50% materii organicznej występującej w błonie powierzchniowej. W tej koncepcji, poniżej warstwy organicznej ale także w jej obrębie znajduje się strefa stanowiąca unikalne środowisko życia dla mikroorganizmów. Mikroorganizmy te zgodnie z określeniem użytym przez Naumana [66] zaliczamy do neuston. Zaś bakterie przerastające całą błonę powierzchniową nazywane są bakterioneustonem.

Rys. 1a



Rys. 1b



Rys. 1. Modele błony powierzchniowej zbiorników wodnych [54]

a – model wyróżniający strefę „suchą” – hydrofobową, zbudowaną głównie z lipidów oraz strefę „mokną” – hydrofilową, zawierającą białka i polisacharydy,

b – model, w którym poszczególne makro komponenty (białka, polisacharydy, lipidy i substancje humusowe) tworzą zhydratowaną, żelo-podobną matrix

W wyniku porównań obu modeli za bardziej prawdopodobny uznaje się obecnie model drugi, w którym wszystkie substancje występują w formie zhydratowanej, żelopodobnej matrix [54]. Jednym z faktów, który przemawia za drugim modelem jest to, że lipidy mimo olbrzymiego wpływu i znaczenia w tworzeniu błony powierzchniowej, nie występują w aż takiej ilości aby mogły utworzyć na powierzchni wody jednorodną warstwę [91].

Początkowa miąższość tej organicznej warstwy lipidów, białek, polisacharydów i substancji humusowych szacowano na około 0,1 μm [77], natomiast obecnie wydaje się, że w swej żelowej postaci może ona dochodzić nawet do kilku mikrometrów [78]. Poza tym ilość organicznych komponentów a więc i grubość filmu może zmieniać się zarówno przestrzennie jak i czasowo [91].

3. Czynniki determinujące przeżywalność i aktywność bakterioneuston

Bakterioneuston w związku ze środowiskiem bytowania jakim jest błona powierzchniowa jest bardziej narażony na działanie stresujących czynników ekologicznych niż mikroorganizmy bytujące w toni wodnej. Potencjalnie szkodliwe czynniki takie jak intensywne promieniowanie słoneczne, temperatura, zmiany zasolenia, obecność toksycznych substancji organicznych, metali ciężkich, odgrywają ważną rolę w walce o przetrwanie i rozwój. Wszystkie te czynniki są selektywne i wpływają na mikrobiologiczny skład tego środowiska.

Pytaniem, które nurtuje wielu badaczy jest: czy suma tych wszystkich niekorzystnych czynników środowiskowych opowadza do stwierdzenia, że interfeza

woda–powietrze jest dla mikroorganizmów środowiskiem ekstremalnym?

Niestety odpowiedź nie jest prosta. Pomimo, że do tej pory nie ma precyzyjnej definicji środowisk ekstremalnych, to pewne środowiska są za takie uważane wówczas gdy występują w nich określone parametry środowiskowe lub ograniczenia w występowaniu organizmów. W pierwszym przypadku „ekstremalność” oznacza osiągnięcie przez czynniki środowiskowe (pH, temperatura, zasolenie, ciśnienie i inne) wartości krańcowych [87]. W drugim ujęciu „ekstremalność” odnosi się do ograniczenia rozwoju organizmów zasiedlających dane środowisko [24]. Oczywiście, przy opisywaniu pewnych wartości poszczególnych czynników pojawia się problem ze zdefiniowaniem co to są „normalne lub średnie” warunki środowiska, a także co oznacza pojęcie słaby rozwój.

W innym ujęciu środowisk ekstremalnych Shilo [75] wskazuje, że powszechnie występują ekosystemy, które tak regularnie jak i sporadycznie fluktuują w kierunku warunków ekstremalnych i dlatego zasłużyły sobie na miano takich środowisk.

Tak więc pomimo faktu, że interfeza woda–powietrze mogłaby być uważana za środowisko, w którym występują wartości krańcowe pewnych czynników środowiskowych (np.: promieniowanie słoneczne), a także że niektóre analizy wskazują na słabszy rozwój mikroorganizmów w tej warstwie [52, 73], to jednak środowisko to wydaje się bardziej zaliczać do kategorii „środowisk fluktuujących”.

Zmiany intensywności promieniowania słonecznego i temperatury są na ogół w błonie powierzchniowej połączone ze sobą i regularne (np. dobowe: dzień – noc, sezonowe: lato – zima), choć mogą być także nieregularne, np. okresowe wychłodzenie powierzchni przez zimny wiatr. Zmiany natężenia tych dwóch czynników mogą też okazać się nieregularne w stosunku do fluktuacji innych czynników takich jak stężenia metali ciężkich, pestycydów czy zasolenia.

Oczywiście w pewnym sensie w takim ujęciu problemu, wszystkie środowiska wodne należałoby uznać za ekstremalne. Tym niemniej interfeza woda–powietrze i neuston jako „super powierzchnia” wody w największym stopniu dotknięte są tymi fluktuacjami i są poddawane tym działaniom podczas gdy głębsze warstwy wody nie doświadczają tego. Dlatego też w dalszej części tej pracy zostaną przedstawione argumenty zarówno za jak i przeciw wypowiedzi Shilo [75], jakoby interfeza woda–powietrze powinna być uznana za środowisko ekstremalne, a neuston charakteryzować się cechami, które pozwalają z sukcesem adaptować się do tego środowiska.

Insolacja słoneczna. Światło docierające do zbiorników wodnych może przenikać nawet do

kilkudziesięciu metrów. Jednak największe natężenie światła notuje się w powierzchniowych kilku, kilkunastu centymetrach [48]. W zależności od stężenia i rodzaju materii organicznej zawartej w wodzie, zmienia się ilość pochłanianego i rozpraszanego promieniowania świetlnego. Przy dużych stężeniach rozpuszczonej materii organicznej, zawierającej znaczne ilości substancji humusowych, szkodliwe promieniowanie UVB dociera do głębokości zaledwie kilku centymetrów [40]. Według Zaitsev'a [93] górne 10 cm powierzchni zbiorników wodnych pochłania około 75% promieniowania UV $\lambda = 254$ nm.

Z promieniowania słonecznego docierającego do interfazy woda–powietrze, biologicznie najważniejsze znaczenie ze względu na szkodliwy charakter ma promieniowanie średnie UV tzw. UVB 290–320 nm., oraz UVA 320–400 nm. [12]. Powoduje ono uszkodzenia DNA (efekt letalny) lub hamuje wzrost organizmów, inhibując syntezę enzymów, redukując transport aktywny i indukując mutacje, wywołując tym samym efekt subletalny [12]. Dlatego nie dziwi fakt, że insolacja słoneczna jest jednym z głównych czynników działających na liczebność i aktywność bakterioneuston. Intensywne promieniowanie słoneczne limituje jak wiadomo liczebność wszystkich mikroorganizmów w zbiorniku wodnym, ale ilość szkodliwego promieniowania UV docierającego do warstw położonych głębiej niż błona powierzchniowa jest zdecydowanie mniejsza w wyniku absorpcji i rozpraszania.

Pomimo licznych doniesień mówiących o potencjalnie niekorzystnym działaniu światła na bakterioneuston, istnieje wiele empirycznych dowodów świadczących o braku różnic w aktywności neuston podczas nasłonecznienia lub braku promieniowania [39] oraz o słabym działaniu UV i światła widzialnego na całkowitą aktywność bakterioneuston [27, 91]. Ponadto Dalbäck [15] wykazał, że większa część bakterii błony powierzchniowej niż wody podpowierzchniowej była zdolna do wzrostu na agarze po napromieniowaniu UV. Te prace wskazują, że część bakterioneuston, która jest aktywna metabolicznie jest relatywnie odporna na efekty działania promieniowania słonecznego.

Oczywiście jedną z prostszych metod radzenia sobie z intensywnym promieniowaniem słonecznym w interfezie woda–powietrze byłoby unikanie go i przebywanie w tej warstwie tylko podczas niskiej intensywności promieniowania.

Jednak dla bakterioneuston niezdolnego unikać promieniowania słonecznego, tolerancja może być osiągnięta dzięki trzem mechanizmom:

1. fizycznej ochronie przez cząstki absorbujące UV umieszczone w ścianie lub błonie komórkowej;
2. efektywnemu systemowi naprawy DNA;
3. ochronie przed produktami fotooksydacji (jak np: tlen singleowy) dzięki barwnikom karotenoidowych.

Wielu badaczy znalazło znaczne ilości bakterii heterotroficznych izolowanych z filmu, posiadających pigmenty ochronne [15, 21, 78]. Udowodniono, że pigmenty karotenoidowe chronią przed szkodliwym wpływem produktów fotoutleniania, a ekspozycja w UVB wywołuje wzrost proporcji pigmentowanych bakterii do niepigmentowanych i być może z tego powodu bakterie z rodzaju *Flavobacterium* osiągają maksymalną liczebność w błonie powierzchniowej w okresie najsilniejszego promieniowania [76].

Szkodliwość promieniowania UV przejawia się głównie tworzeniem dimerów tyminowych w nici DNA [12, 65]. Singer i Ames [79] sugerują, że bakterie ekspozowane na UV powinny posiadać wysoką zawartość par zasad guanina–cytozyna (G+C) dla uniknięcia powstawania dimerów tyminowych, co można interpretować jako swego rodzaju przystosowanie do egzystowania w mikrowarstwie. Badania stosunku molowego G+C u bakterii wyizolowanych z błony powierzchniowej wykazały, że wiele z nich (10 z 16), łącznie z potencjalnie patogennymi rodzajami jak *Klebsiella* czy *Salmonella* ma stosunek par G+C większy niż 50%. Natomiast większość przebadanych rodzajów jak *Alcaligenes*, *Micrococcus*, i *Pseudomonas* miały molowy udział par G+C pomiędzy 56 a 75 % [55]. To powierzchniowe badanie kilkunastu rodzajów bakterii wyizolowanych z błony powierzchniowej potwierdza hipotezę Singera i Ames'a [79]. Tym niemniej, pomimo korzystnego stosunku par G+C, istotną rolę w adaptacji i życiu bakterioneustonów powinny odgrywać systemy naprawcze uszkodzonego DNA (fotoreaktywacja, rekombinacja, SOS). Poza tym sam system SOS może być błędotwórczy, zwiększając tym samym częstość mutacji, które mogą zwiększać przeżywalność bakterii.

Błędy powstające w trakcie naprawy DNA stanowią połowę spontanicznych mutacji u bakterii [81]. Tak więc paradoksem jest, że sprawne systemy naprawcze mogą zwiększać częstość mutacji, często korzystnych z punktu widzenia przeżywalności bakterii w błonie powierzchniowej.

Kolejny mechanizm pozwalający na funkcjonowanie bakterioneustonów pomimo promieniowania UV to plazmidy, których obecność stwierdził Jones i wsp. [41]. Plazmidy te mogą kodować oporność bakterii na promieniowanie UV, a nabywanie plazmidów może być ważnym krokiem przystosowawczym.

Docierające do błony powierzchniowej promieniowanie UV działa na bakterie również pośrednio i to w pewnym sensie korzystnie. Zawarte w wodzie błony powierzchniowej związki organiczne pod wpływem promieniowania UVB ulegają częściowej fotolizie. W wyniku zachodzących reakcji fotochemicznych, odporne na rozkład mikrobiologiczny związki organiczne, głównie substancje humusowe są częściowo roz-

kładane zwiększając tym samym pulę dostępnego węgla organicznego [39]. Powstające w ten sposób niskocząsteczkowe związki węgla są szybko wykorzystywane przez bakterioplankton, co prowadzi do wzrostu produkcji wtórnej bakterii. Z drugiej strony fotochemiczny rozkład wielkocząsteczkowych substancji węglowych prowadzi do zmniejszenia absorpcji promieniowania UVB w powierzchniowych warstwach wody i zwiększenia głębokości przenikania tego promieniowania [35]. Ponadto zachodzące reakcje fotochemiczne skutkują również powstawaniem wielu ważnych gazów jak ozon i wolnych rodników [25]

Ozon. Ten niebezpieczny gaz powstaje w wyniku reakcji fotochemicznych z udziałem węglowodorów i NO_x (tlenków azotu). Z przeprowadzonych badań wynika, że tuż nad powierzchnią zbiorników wodnych powstają znaczne ilości ozonu [25]. Następnie gaz ten penetruje w głąb wody. Co ciekawe przenikanie ozonu przez błonę powierzchniową jest od 10–30 razy większe niż wynikałoby to z prostej dyfuzji [28]. Mikrowarstwa powierzchniowa występująca jako bariera w wymianie materii i energii pomiędzy wodą a powietrzem, jednocześnie jest bardzo bogata w materię organiczną i związki chemiczne, które mogą reagować z ozonem w trakcie penetracji tego gazu z atmosfery do wody [28].

W środowisku morskim ważną reakcją chemiczną w mikrowarstwie powierzchniowej jest utlenianie przez rozpuszczony ozon jodków do jodu. W ten sposób reaguje około 20% ozonu pochłanianego przez błonę powierzchniową mórz tworząc jod w formie gazowej, emitowany do atmosfery [28]. Według tego autora pozostała część (około 80%) ozonu absorbowanego przez błonę powierzchniową reaguje z materią organiczną występującą w tej warstwie.

Z drugiej strony Creclius [13] stwierdził, że ozon penetrujący do błony powierzchniowej może reagować z bromkami tworząc kwas podbromowy i jon podbromowy a być może także wolny brom, który jest toksyczny dla środowiska.

Toksyczny wpływ ozonu na środowisko przejawia się w dwojaki sposób. Po pierwsze powoduje on utlenianie mikroorganizmów, podobnie jak to ma miejsce podczas ozonowania wody czy ścieków w celach dezynfekcyjnych. Po drugie, uczestniczy w tworzeniu w środowisku wodnym, zwłaszcza morskim, wolnego bromu, który jest toksyczny.

Bardzo niewiele wiadomo o działaniu ozonu w wodach śródlądowych. Z prac von Gunten i Hoigne [33] wiadomo, że powstawanie bromu w tych środowiskach następuje poprzez działanie ozonu i/lub wolnych grup hydroksylowych (OH), zaś te komponenty powstają przy udziale promieniowania UV.

Temperatura. Konsekwencją absorpcji energii słonecznej jest stratyfikacja termiczna w zbiorniku wodnym, a stymulujący wpływ temperatury na żywe organizmy uważa się za zjawisko powszechne w strefie klimatu umiarkowanego. Temperatura oddziałuje na bakterie w dwojaki sposób:

1. bezpośrednio – oddziałując na szybkość przemian metabolicznych zachodzących w mikroorganizmach;
2. pośrednio – poprzez zmiany fizykochemiczne parametrów wody np: zawartości tlenu, lepkości, stężenia soli mineralnych, zmiany pH, potencjału redoks.

Bakterioneuston jest narażony na działanie ciepła zarówno od strony wody, jak również bezpośrednio przez absorpcję promieniowania słonecznego [68].

Na przestrzeni kilkuset mikrometrów wraz z głębokością zmienia się temperatura [36]. *Zaitsev* [93] odnotował w warstwie powierzchniowej o różnicy głębokości 20 cm, spadek temperatury aż o 1,6°C. Jednocześnie autor ten obserwował wzrost temperatury powierzchniowej warstwy wody morza do 27,6°C jako efekt intensywnego pochłaniania energii świetlnej. Podobne zjawisko stwierdził *Walczak* [2003, dane niepublikowane] w zbiornikach śródlądowych, gdzie temperatura powierzchniowej warstwy wody przekraczała 30°C.

Ponadto w błonie powierzchniowej występują wahania temperatury, często odekватne do warunków klimatyczno-pogodowych, a część tych zmian jest regularna (np.: zmiany dobowe, sezonowe). Sezonowe działanie temperatury na bakterioneuston może uwiadczać się w trakcie tworzenia pokrywy lodowej. Nocne tworzenie się lodu, podczas jesiennych przymrozków, jest czynnikiem oddziałującym negatywnie na populację neuston, jego wielkość i aktywność [55]. Według tych autorów po nocnym powstaniu lodu i rozpuszczeniu go w pierwszej części dnia, potrzebny jest upływ czasu do utworzenia warstwy neustowej. Determinuje to z pewnością rozwój życia biologicznego i kinetykę przemian biochemicznych organizmów zasiedlających tę warstwę wody.

Maki i Herwig [55] zaobserwowali, że zmiany temperatury błony powierzchniowej stawów Arktyki, pociągają za sobą zmiany takich parametrów mikrobiologicznych jak TNB czy CFU. Krótkie i gwałtowne zmiany temperatury, powodują zwiększenie bakteryjnej bioróżnorodności. Jest to efektem powstawania cienkich warstw wody różniących się temperaturą co prowadzi do tworzenia się różnych termicznych niszy zasiedlanych przez bakterie o odmiennych wymaganiach termicznych [86]. Wynika z tego, że zmiany temperatury mogą wpływać na konkretne typy bakterii, ale nie mogą oddziaływać negatywnie na populację bakterioneuston jako całość.

Metale ciężkie. Akumulacja metali w błonie powierzchniowej zbiornika w dużym stopniu zależy od licznych czynników takich jak: skład mikrowarstwy, fizyczna i chemiczna postać metalu, procesy kontrolujące transport, czas trwania błony i czas trwania metalu w błonie.

Toksyczność metali zależy od stężeń i rozpuszczalności ich związków w wodzie, a także od reaktywności chemicznej tj. zdolności do tworzenia składników kompleksowych. Najbardziej toksyczne są nieorganiczne połączenia metali, dobrze rozpuszczalne w wodzie, natomiast organiczne – wykazują znacznie mniejszą szkodliwość.

Stąd też jednym z czynników stresu ekologicznego w błonie powierzchniowej mogą być właśnie metale ciężkie. W biofilmie, w zależności od stężenia metali i obecności substancji chelatujących, często można obserwować ostrą toksyczność dla mikroorganizmów. Toksyczność metali ciężkich jest głównie związana z ich formą jonową. W błonie powierzchniowej większość metali jest powiązana z rozpuszczoną lub cząstkową materią organiczną [37]. Mimo że połączenia tego typu redukują toksyczność to często metale występują w wystarczająco wysokich stężeniach aby stanowić zagrożenie dla bakterioneuston [37]. Ponadto duża część bakterioneuston również adsorbuje się na cząstkach materii organicznej występującej w błonie powierzchniowej, co ułatwia oddziaływanie metali z komórkami.

Istnieją też doniesienia o przystosowaniu mikroorganizmów do metali ciężkich. Bakterie izolowane z mikrowarstwy powierzchniowej, wykazywały większą oporność czy tolerancję na obecność pewnych metali niż bakterie z toni wodnej [22, 42, 64].

Oporność bakterioneuston na metale jest często związana z obecnością w komórkach bakterii plazmidów a niekiedy jest także kodowana w DNA komórkowym [84]. Bakterie mają też zdolność zmiany wartościowości metali, ich metylacji lub demetylacji w wyniku czego przyjmują one postać obojętną lub lotną.

Bakterioneuston może przyczynić się do wylapywania metali w biofilmie, co jest możliwe dzięki produkcji zewnątrzkomórkowych biopolimerów, które wiążąc jony metali chronią komórki [31]. Ale znaczne podwyższenie stężenia jonów metali ciężkich, tak jak ma to miejsce w mikrowarstwie powierzchniowej [37], może prowadzić do biosorpcji i akumulacji ich w komórkach bakteryjnych.

Pestycydy, węglowodory i substancje powierzchniowo czynne. W wielu badaniach wykazano obecność w błonie powierzchniowej licznych grup węglowodorów. Należą one głównie do nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w wodzie węglowodorów pochodzących z ropy nafto-

wej, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych np.: fenantren, antracen, polichlorowanych bifenyle, czy organicznych pestycydów. Oprócz tej grupy stwierdzono także komponenty o charakterze rozpuszczalnych w wodzie fenoli [92]. Pochodne ropy naftowej, jak i inne związki aromatyczne występują w błonie powierzchniowej obok licznych innych substancji organicznych. Niektóre z nich są łatwo rozkładalne, inne zaś są odporne na biodegradację.

Ze względu na swój hydrofobowy charakter węglowodory aromatyczne występują na olbrzymiej powierzchni zbiorników wodnych, tworząc rodzaj filmu. Tym niemniej rozmieszczenie tych substancji na powierzchni wód nie jest równomierne [11]. Błona powierzchniowa jest na ogół wzbogacona w węglowodory w stosunku do wody podpowierzchniowej, chociaż skład i struktura węglowodorów w tych dwóch warstwach wody są całkiem różne [8]. Obecne w błonie powierzchniowej polichlorowane bifenyle łatwo kumulują się w tej warstwie, a głównym ich źródłem jest depozycja atmosferyczna [85].

Obecne w błonie powierzchniowej węglowodory w formie rozpuszczonej czy zawieszanej, w pewnych okolicznościach mogą być przekształcane w upostaciowaną materię organiczną [11], w innych warunkach, w procesie fotooksydacji przy udziale UV mogą ulegać przekształceniom w kwasy organiczne, a niekiedy tworzą emulsję wodno-olejową. Upostaciowane węglowodory mogą stanowić istotną część cząstkowej materii organicznej (POM – Particulate Organic Matter) w obrębie błony powierzchniowej [62]. Takie organiczne cząstki zbudowane z węglowodorów lub innych sztucznych substancji stanowią doskonałe środowisko do kolonizacji przez żywe organizmy, zwłaszcza równonogi, glony i bakterie. Jednak z drugiej strony, zwiększone stężenia pestycydów i innych węglowodorów w błonie powierzchniowej mogą wykazywać hamujący wpływ na wzrost i przeżywalność organizmów neustonowych. Substancje tego typu działają niekorzystnie na błony komórkowe, syntezę kwasów nukleinowych, aminokwasów i białek, zmieniają aktywność enzymów oraz mogą inicjować mutacje. Ponadto obecność pestycydów może hamować biodegradację węglowodorów przez bakterioneuston. Pomimo tego komponenty te ulegają rozkładowi na drodze biologicznej, a mechanizmy biodegradacji zostały szczegółowo opisane [50].

Badania nad bakterioneustonem rozkładającym węglowodory generalnie wykazały, że wytwarza on zewnątrzkomórkowe biopolimery. Polimery te wykazują zdolność emulgowania węglowodorów ropy naftowej ułatwiając ich biodegradację [71]. Ponadto stwierdzono, że geny kodujące enzymy niezbędne w procesie biodegradacji węglowodorów są często zgromadzone w plazmidach [50].

Ze względu na występowanie w błonie powierzchniowej szczepów zdolnych do rozkładu węglowodorów z dużą wydajnością, często używano sformułowania „bakterioneuston rozkładający węglowodory ropy naftowej” [71]. Określenie to było używane w odniesieniu do całej populacji mikroorganizmów zasiedlających błonę powierzchniową. Tym czasem, z części badań wynika, że biodegradacja węglowodorów w błonie powierzchniowej nie zachodziła z większą wydajnością a niekiedy była nawet mniejsza niż w wodzie podpowierzchniowej [32]. Ponadto wielkość populacji bakterioneuston, zdolnej do rozkładu węglowodorów ulega czasowym i przestrzennym zmianom. Zmienność populacji zdolnej do biodegradacji tych substancji zaobserwował również Walczak i współpracownicy [88]. Jednak te badania wykazały, że bakterie izolowane z błony powierzchniowej lepiej rozkładały węglowodory aromatyczne, zarówno jednolite i wielopierścieniowe.

W błonie powierzchniowej oprócz hydrofobowych węglowodorów kumulują się także substancje powierzchniowo czynne. Są to związki stosowane jako środki piorące, emulgujące, pieniące, zwilżające, flotujące itd. Mają one właściwości gromadzenia się przy powierzchni cieczy i zmniejszają jej napięcie powierzchniowe [20].

Substancje powierzchniowo czynne, w błonie powierzchniowej zbiorników wodnych wywołują określone skutki. Przede wszystkim dla części organizmów wodnych są to związki toksyczne. Detergenty anionowe najpowszechniej stosowane, częściej są zabójcze dla bakterii Gram-dodatnich, nie wywołując żadnych skutków u bakterii Gram-ujemnych. Podobnie jak węglowodory aromatyczne i pestycydy również detergenty są bardzo zróżnicowane, jeśli chodzi o ich podatność na rozkład mikrobiologiczny. Wiele z nich, np. dodecylsulfian sodu (SDS) ulega stosunkowo łatwo rozkładowi pod wpływem działania bakterii, głównie z rodzaju *Pseudomonas* [47]. Są jednak i inne, niezwykle odporne, nie ulegające rozkładowi. Z przeprowadzonych badań wynika, że w błonie powierzchniowej detergenty anionowe mogą osiągać znaczne stężenie (do 3 mg/l), zagrażając funkcjonowaniu żywych komórek [90]. Jednocześnie ich stężenia w wodzie podpowierzchniowej są dalece niższe. Z badań tych wynika, że bakterie pozyskiwane z błony powierzchniowej świetnie radzą sobie z rozkładem detergentów anionowych i przeprowadzają ten proces ze znacznie większą wydajnością niż bakterie planktonowe.

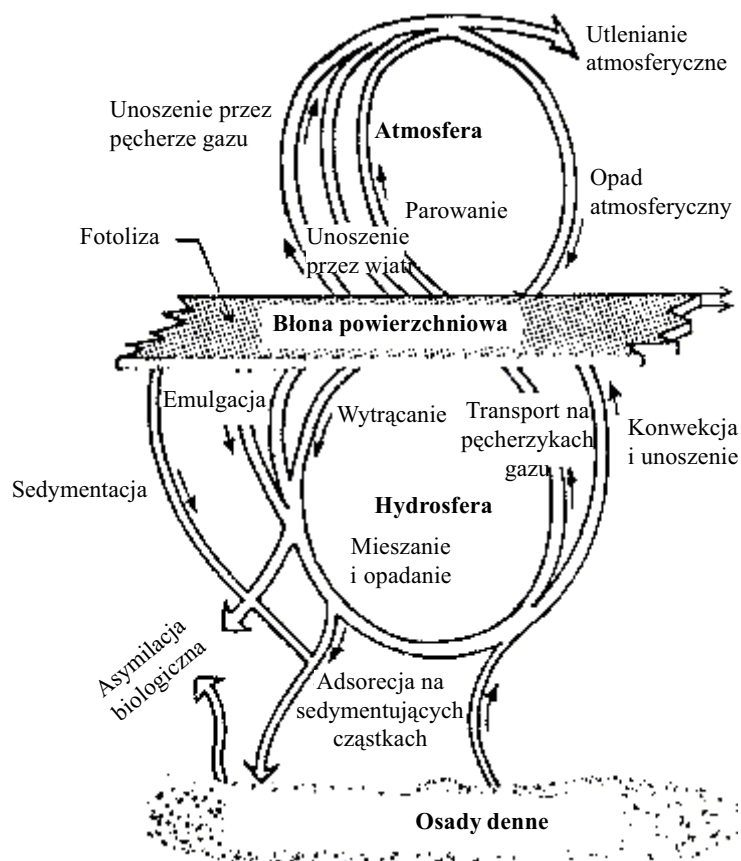
Substancje pokarmowe. Dotychczasowe badania wskazują na różnorodność materii organicznej, która w błonie powierzchniowej osiąga dalece wyższe stężenia niż kilka centymetrów poniżej. Substancje odżywcze występujące w tej warstwie pochodzą

z różnych źródeł: biosyntezy, dopływu na drodze wynoszenia z toni wodnej, opadu atmosferycznego, źródeł antropogennych. Wzbogacenie błony powierzchniowej w substancje organiczne (białka, polisacharydy, tłuszcze) oraz związki mineralne (fosforany, jony amonowe, azotany, azotyny) zostało przedstawione zarówno dla środowisk morskich [26, 58] jak i wód śródlądowych [16, 46, 56] (Rys. 2). Ilość materii organicznej jest stale większa w mikrowarstwie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej. Tak zwany współczynnik wzbogacenia E, czyli stosunek stężenia danej substancji w mikrowarstwie powierzchniowej do stężenia tej substancji w wodzie podpowierzchniowej, wynosi dla: rozpuszczonej materii organicznej (DOM – Dissolved Organic Matter) – 0,8; POM – 2,2; rozpuszczonych węglowodorów 1,3–19; substancji aktywnych powierzchniowo 2,8–3,1; lipidów 1,6–4,4; [58].

Wśród całej puli materii organicznej, część substancji o charakterze aktywnej powierzchniowo, słabo rozpuszcza się w wodzie, w związku z czym wykazuje tendencję do akumulacji w mikrowarstwie powierzchniowej. Większość substancji organicznej występującej w mikrowarstwie powierzchniowej obniża napięcie powierzchniowe wody i dzięki temu może adsorbować się w obrębie interfazy woda–powietrze. Natomiast nieorganiczne jony podnoszą napięcie powierzchniowe

wody nie ulegają adsorpcji lecz są wymywane do wody podpowierzchniowej [52]. *Dumas* i wsp. [17] uważają, że w ściślejszej mikrowarstwie (do 100 μm) akumulują się mikrocząstki organiczne, podczas gdy rozpuszczalne biogeny w postaci nieorganicznych jonów są zakumulowane w nieco grubszej warstwie wody (do 1 μm). Natomiast *Danos* i wsp. [16] stwierdzili stratyfikację w mikrowarstwie powierzchniowej zarówno mineralnych form azotu (NO_3 , NO_2 , NH_3) jak i całkowitego azotu organicznego oraz całkowitego fosforu. Najwyższe stężenia obserwowali w warstwie 50 μm , nieco niższe w warstwie 300 μm i najniższe w wodzie podpowierzchniowej. W mikrowarstwie powierzchniowej istnieje dodatnia korelacja pomiędzy ilością substancji organicznych a liczebnością mikroorganizmów [78]. *Harvey* i *Young* [38] przedstawili wyniki świadczące, że liczebność bakterii w warstwie wody grubości około 300 μm jest wprost proporcjonalna do stężenia POM, a bakterie związane z POM stanowiły 40–80% całkowitej puli bakterii.

Według *Williamsa* i wsp. [91] stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (DOC – Dissolved Organic Carbon), rozpuszczonego azotu organicznego (DON – Dissolved Organic Nitrogen) i rozpuszczonego fosforu organicznego (DOP – Dissolved Organic Phosphorus) w mikrowarstwie powierzchniowej są



Rys. 2. Mechanizmy wzbogacania i zubażania błony powierzchniowej [30] (za zgodą wydawcy)

wyższe o 1,7 do 4,9 razy niż w głębszych warstwach wody. Jednocześnie w mikrowarstwie stężenia cząstkowego węgla organicznego (POC – Particulate Organic Carbon) i cząstkowego azotu organicznego (PON – Particulate Organic Nitrogen) były wyższe niż DOC i DON, co sugeruje, że materia upostaciowana jest źródłem form rozpuszczonych.

Podobnie jony PO_4^{3-} notowano w wyższych stężeniach w mikrowarstwie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej. Jest to prawdopodobnie konsekwencją adsorpcji tych jonów na pęcherzykach gazu i flotacji ich ze zbiornika do błony powierzchniowej lub efektem mineralizacji upostaciowanej i rozpuszczonej puli organicznego fosforu, zachodzącej *in situ* w mikrowarstwie powierzchniowej [85].

Jednym z ciekawszych i bardziej kontrowersyjnych zjawisk zachodzących w błonie powierzchniowej jest konwersja materii organicznej występującej w formie rozpuszczonej (DOC) w formę upostaciowaną (POC). To fenomenalne zjawisko zostało po raz pierwszy opisane przez Sutcliffe i wsp. [85]. Dalsze eksperymenty wykazały, że przepływające pęcherze powietrza mogą wytwarzać cząstkowe agregaty z filtrowanej wody zawierającej DOC [5]. Wykazano, że uformowane w ten sposób cząstki materii (POC) mogą stanowić źródło cząstkowego pożywienia dla organizmów morskich [5], a także, że te organiczne cząstki mogą wyłapywać z wody i adsorbować na swojej powierzchni związki fosforu i materię organiczną [85]. Dalsze badania wykazały, że aby to zjawisko zachodziło muszą być obecne bakterie. Mianowicie Batoosingh i wsp. [4] wykazali, że upostaciowana materia organiczna może powstawać z DOC tylko podczas występowania specyficznych warunków – konieczna jest obecność cząstek stanowiących „zarodki” o rozmiarach około 0,22–1,2 μm . W środowisku naturalnym, w błonie powierzchniowej rolę tych „zarodków” pełnią właśnie bakterie.

Z badań Garrett'a [29] wynika, że POC mikrowarstwy powierzchniowej składa się głównie z cząstkowych i rozpuszczonych kwasów tłuszczowych, estrów alkoholi i kwasów tłuszczowych oraz węglowodorów. Zaobserwowano również, że rozpuszczony węgiel organiczny obejmujący kwasy tłuszczowe nasycone i nienasycone, rozgałęzione i tzw. ciężkie (>20 atomów C) występuje w podobnych stężeniach w mikrowarstwie powierzchniowej i wodzie podpowierzchniowej lub czasami przeważa w mikrowarstwie. Natomiast te same związki ale w postaci POC są o kilkaset procent bardziej stężone w mikrowarstwie powierzchniowej [58]. Kwasy tłuszczowe o charakterze rozgałęzionym są uważane za produkt bakteryjny, zaś Marty i wsp. [58] stwierdzili znacznie większe ilości tych związków w POC niż DOC w mikrowarstwie powierzchniowej, co potwierdza fakt adhezji bakterii na POC o średnicy >0,7 μm .

Odwrotna sytuacja jest w odniesieniu do kwasów tłuszczowych wielonienasyconych, które są produktem fitoplanktonu. Związki te przeważają w wodzie podpowierzchniowej. Dodatkowym czynnikiem zubażającym mikrowarstwę powierzchniową w te związki jest ich degradacja przez UV.

Generalnie wody naturalne (morza i jeziora oligotroficzne) zawierają na tyle mało materii organicznej, iż limituje ona wzrost bakterii. Tym niemniej, akumulacja materii organicznej na granicy faz woda–powietrze jest na tyle znaczna w porównaniu z wodą podpowierzchniową, że stanowi istotny potencjał odżywczy dla bakterii. Stąd też stosunek ilości bakterii w błonie powierzchniowej do ilości bakterii w wodzie podpowierzchniowej jest większy w jeziorach oligotroficznym niż eutroficznym [14].

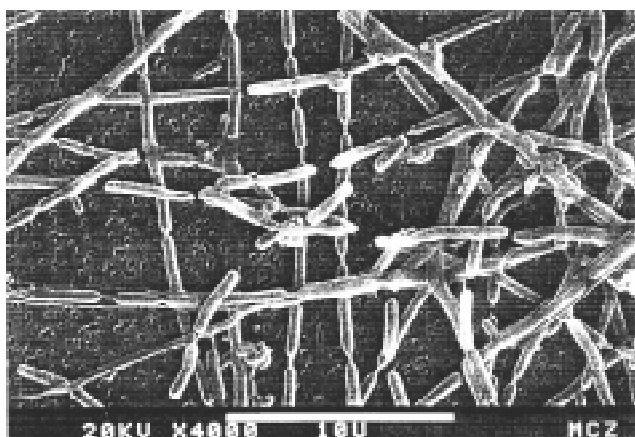
Stężenia węgla organicznego są zawsze większe w mikrowarstwie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej i to o kilka rzędów wielkości. Z tego wynika, że pod względem odżywczym nie ma tu mowy o ograniczaniu wzrostu bakterii. Powierzchniowa mikrowarstwa według Norkrans [68] może być nawet zbyt bogatą „zupą” dla rozwoju pewnych drobnoustrojów z wody podpowierzchniowej. Potwierdzają to spostrzeżenia Sieburtha i wsp. [77], którzy stwierdzili, że próby wody zbierane z błony powierzchniowej dorównują stężeniom materii organicznej występującym w pożywkach laboratoryjnych.

4. Bakterioneuston

Błona powierzchniowa środowisk morskich i śródlądowych stanowi unikalne środowisko dla mikroorganizmów w odniesieniu do wody podpowierzchniowej.

Obecność wysokich stężeń związków organicznych i mineralnych w mikrowarstwie powierzchniowej, stwarza optymalne warunki rozwoju auto- i heterotroficznej mikroflory. Organizmy tego środowiska charakteryzują się obecnością w ich zewnętrznych strukturach komórkowych mukopolisacharydów, glikoproteidów i polimerów fosfatydylocholinowych, które jako związki hydrofobowe wykazują właściwość aktywnego łączenia się z błoną powierzchniową wody [57]. Osiedlają się one w tej warstwie dzięki adhezji do związków organicznych, głównie ziaren skrobi, kropli tłuszczu lub włókien celulozy [34].

Laboratoryjne eksperymenty z zastosowaniem sztucznej błony powierzchniowej, utworzonej z jednej i wielu warstw lipidów oraz kwasów tłuszczowych wykazały, że pewne komórki bakteryjne penetrują film lipidowy podczas gdy inne tworzą warstwę pod spodem [43]. Ponadto struktura i skład błony powierzchniowej odgrywają ważną rolę w bakteryjnej adhezji [45]. Wielowarstwowy film lipidowy charakteryzuje



Rys. 3. Zbiornisko bakterii neustonowych [54]
(za zgodą wydawcy)

się większym wzbogaceniem w bakterie niż film jednowarstwowy [69]. Grubość „warstwy bakteryjnej” może być uzależniona od ilości komórek aktywnych powierzchniowo [9].

Bakterie wykazują dwa typy adhezji do powierzchni: trwałą – powstałą na skutek oddziaływania substancji typu zewnątrzkomórkowych biopolimerów i odwracalną – kiedy bakterie są przyciągane do powierzchni, ale nie wiążą się trwale [57]. Bakterioneuston ma skłonność do szybkiego wiązania się z jakąkolwiek substancją, na której może być wyniesiony do błony powierzchniowej [19]. Głównie wiązanie zachodzi pomiędzy komórkami bakterii a cząstkową materią organiczną występującą w błonie powierzchniowej [38].

Co więcej, bakterioneuston obdarzony możliwością aktywnego ruchu może posiadać zdolność do zmiany siedliska pomiędzy interfazą woda–powietrze a wodą podpowierzchniową. To sugeruje, że „ruchliwa” część bakterioneustonu może żyć w regularnych cyklach obejmujących dwuwarstwę (błonę powierzchniową i wodę podpowierzchniową). Mikroorganizmy te przebywałyby w błonie powierzchniowej w trakcie korzystnych warunków, wyjadając substancje odżywcze, a po pojawieniu się warunków stresu ekologicznego, przechodziły by do wody podpowierzchniowej. Zmiany tego typu zostały opisane dla zbiorników śródlądowych [55, 89] oraz zbiorników estuariowych [80]. Jednak w wielu przypadkach zmiany te są trudne do wychwycenia ze względu na wielką liczebność bakterii uwięzionych na stałe w błonie powierzchniowej [56].

Poza tym bakterie mogą być transportowane do błony powierzchniowej z głębszych warstw wody za pośrednictwem wydobywających się pęcherzy gazów [7]. Unoszące się pęcherze gazu mogą częściej „wychwytywać” i transportować pewne typy bakterii. Należą do nich na przykład bakterie barwne, co jest najprawdopodobniej konsekwencją różnic w budowie zewnętrznych powłok komórkowych [7]. Tak więc ten różnicujący transport do błony powierzchniowej jest już pierwszym

etapem selekcji jakiej podlegają bakterie zasiedlające błonę powierzchniową. Ponadto mechanizm wynoszenia bakterii na pęcherzach gazu poniekąd przywraca błonie powierzchniowej te drobnoustroje, które zostały wyparte z niej na skutek pewnych niekorzystnych zjawisk fizycznych jak np. deszczu czy silnego wiatru [54].

Już w 1901 roku Schmidt-Nielsen badając prawa rządzące pionowym rozmieszczeniem bakterii w Morzu Północnym, stwierdził istnienie różnic pomiędzy liczebnością mikroorganizmów w warstwie filmu, a warstwą położoną kilka milimetrów głębiej [74]. Obecnie wszyscy badacze skłaniają się do wniosku o wyższej liczebności komórek bakteryjnych w mikrowarstwie powierzchniowej wszystkich zbiorników wodnych [15, 21, 23, 55, 63, 77]. Tak zwany współczynnik wzbogacenia „E” (obrazujący iloraz wartości osiągniętych w błonie powierzchniowej do tych w wodzie podpowierzchniowej) ogólnej liczby bakterii w badaniach Kjelleberga i wsp. [44] osiągnął rekordową wartość 10^2 – 10^4 .

W wielu badaniach wykazano również, że liczebność „żywych bakterii” (jako CFU) jest także większa w warstwie neustonowej niż podpowierzchniowej [16, 21, 23].

Pomimo bezdyskusyjnej olbrzymiej ogólnej liczby bakterii (TNB) w błonie powierzchniowej, część badaczy zauważyła, że ilość „żywych” bądź aktywnych komórek bakteryjnych nie jest już tak imponująca i na ogół odpowiada ilości występującej w wodzie podpowierzchniowej [6, 59]. Obserwowany niski współczynnik ogólnej liczby do liczebności komórek „żywych” czy aktywnych sugeruje, że przyczyną tego mogą być niekorzystne warunki panujące w błonie powierzchniowej [68].

Jednak dalsze badania z wykorzystaniem metody bezpośredniego liczenia na filtrach membranowych w połączeniu z redukcją INT (chlorek (2-[4-jodofenylo]-3-[4-nitrofenylo])-5-fenylotetrazoliowy) do formazanu w celu oznaczenia bakterii aktywnych oddechowo lub z wykorzystaniem technik mikroautoradiografii wykazały, że bakterie aktywne metabolicznie były liczniejsze w błonie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej, zarówno w środowiskach śródlądowych jak i morskich [38, 56], a większość aktywnego bakterioneustonu była związana z cząstkową materią organiczną [38]. Jednak z drugiej strony w badaniach tego typu wykazano, że choć liczebność bakterii aktywnych metabolicznie była większa w błonie powierzchniowej, to procentowy udział bakterii aktywnych był zbliżony dla warstwy neustonowej i wody podpowierzchniowej [56].

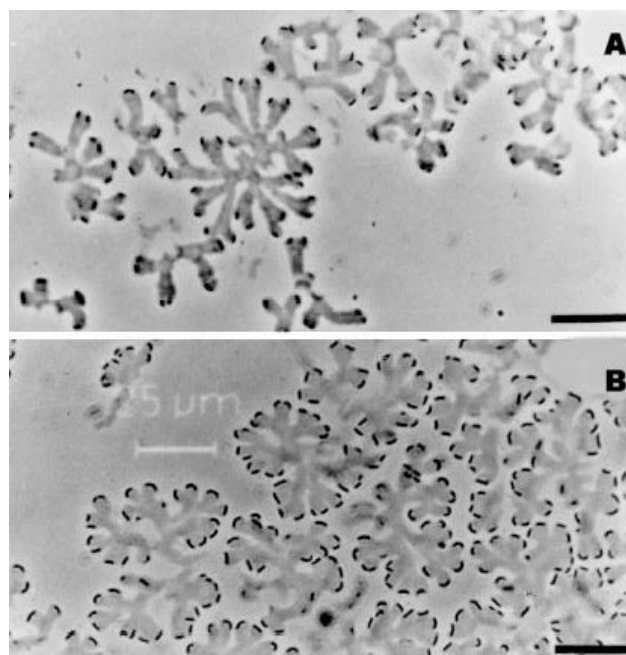
W wyniku badań z wykorzystaniem INT stwierdzono, że stosunek ilości bakterii aktywnych do CFU był o około 15 razy mniejszy w błonie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej [15]. Natomiast stosunek liczby komórek aktywnych do całkowitej ich liczby jest o kilka rzędów wielkości mniejszy niż stosunek liczby komórek aktywnych do CFU.

Wynika z tego, że ogólna liczba bakterii w błonie powierzchniowej, choć bardzo wysoka, nie jest efektem aktywności podziałowej bakterioneustonów a raczej wynikiem kumulacji komórek bakteryjnych, zachodzącej pod wpływem sił i zjawisk fizycznych [59]. Przy czym nieznaną jest ilość komórek martwych nie odgrywających żadnej roli biologicznej w tej warstwie.

Znane są także badania, w których wykazano większą liczbę bakterii w wodzie podpowierzchniowej niż w neustonie [70]. Jednak z drugiej strony pomiar stężenia ATP, jako wskaźnika bakteryjnej biomasy, wykazał większe ilości tej biomasy w błonie powierzchniowej [91].

Opisane powyżej wyniki badań wskazują, że przynajmniej część bakterioneustonów jest zdolna do aktywnego metabolizmu pomimo inhibującego działania wielu niekorzystnych czynników w tym środowisku. Potwierdzeniem tego są rezultaty opisujące badania nad tempem wchłaniania substancji znakowanych izotopowo. Stwierdzono w nich, że aktywność wchłaniania różnych substancji jest zbliżona dla mikroorganizmów zasiedlających błonę powierzchniową i wodę podpowierzchniową [91]. Natomiast podczas występowania na powierzchni zbiorników tzw. „gładzi”, aktywność była wyższa w błonie powierzchniowej [18]. Obserwowano także różnice w aktywności biochemicznej mikroorganizmów uzależnione od trofii zbiornika. W zbiornikach oligotroficznym drobnoustroje błony powierzchniowej były bardziej aktywne niż te z wody podpowierzchniowej, ale już w zbiornikach eutroficznym aktywność metaboliczna bakterii obu warstw była zbliżona [91].

Z taksonomicznego punktu widzenia bakterioneuston jest słabo poznany, chociaż analizy przeprowadzone przez wielu badaczy wskazują na jego dość specyficzny skład gatunkowy. Wyniki badań dowodzą, że ponad połowa z izolowanych szczepów bakteryjnych to Gram-ujemne pałeczki, zwykle w ponad 50% ruchliwe [21]. Analiza szczepów bakteryjnych pozwoliła zaliczyć je do rodzajów: *Bacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, grupy *Vibro-Aeromonas*, rodziny *Enterobacteriaceae* [23, 67]. Natomiast według Carty'ego i Colwell'a [10] szczepy dominujące w błonie powierzchniowej należą głównie do rodzajów *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* i *Spirillum*. Przy czym z pośród wymienionych grup bakterii, w danym zbiorniku wodnym jeden, dwa lub trzy rodzaje stanowią często do 50% wszystkich bakterii. Tym samym bioróżnorodność bakterioplanktonu błony powierzchniowej jest znacznie mniejsza niż w wody podpowierzchniowej. Co ciekawe, z badań tych wynika także, że te same szczepy dominują w powietrzu tuż nad mikrowarstwą powierzchniową. Jednak najciekawsze szczepy bakteryjne to te, które wyizolo-



Rys. 4. *Nevskia ramosa* – charakterystyczne rozety [83]
(za zgodą wydawcy)

wano tylko i wyłącznie z błony powierzchniowej. Przykładem takiej bakterii jest *Nevskia ramosa*, która wykazuje silnie hydrofobowe właściwości (Rys. 4).

Wspomniana wcześniej większa frekwencja pałeczek w filmie powierzchniowym może być wynikiem większej zasobności pokarmowej i/lub wyższej specyficzności taksonomicznej wśród bakterioneustonów, a tym samym jego mniejszej różnorodności form. Wiadomo bowiem, że pomimo olbrzymiej ogólnej liczby bakterii, ich bioróżnorodność jest mniejsza niż bakterii występujących w wodzie podpowierzchniowej [61], co wynika prawdopodobnie ze specyficznych, selektywnych warunków występujących w mikrowarstwie powierzchniowej.

Liczebność ziarniaków i laseczek jest znacząco niższa w błonie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej, co również można wytłumaczyć większą specyficznością gatunkową bakterii neustonowych. Natomiast przecinkowce, jak twierdzi wielu badaczy występują powszechnie w mikrowarstwie powierzchniowej zbiorników wodnych [23, 67].

Jak wspomniano wcześniej w związku z długotrwałą ekspozycją na promieniowanie słoneczne bakterie neustonowe w ponad 50% wytwarzają pigmenty ochronne [93]. Podobne wyniki uzyskał Mudryk i wsp. [63] prowadząc badania na obszarze Głębi Gdańskiej. Dominuje przy tym często pigmentacja jasna: żółta i pomarańczowa.

Badania właściwości fizjologiczno-biochemicznych bakterii wyizolowanych z błony powierzchniowej wskazują, że znaczna większość z nich rozkłada tłuszcze (około 90%), i białka (40–90%). Tym samym

liczebność bakterii lipolitycznych czy proteolitycznych w błonie powierzchniowej jest na ogół zdecydowanie większa niż w wodzie podpowierzchniowej, co jest konsekwencją budowy mikrowarstwy powierzchniowej, bogatej w tłuszcze i białka. Natomiast zdolność rozkładu skrobi stwierdzono już tylko u około 20–40% wszystkich szczepów bakterioneuston [21].

Dotychczasowe wyniki badań świadczą także o odmiennych właściwościach bakterioneuston w odniesieniu do nietypowych substratów, takich jak węglowodory aromatyczne. Bakterioneuston odznacza się większą intensywnością i wydajnością rozkładu tych związków niż bakterioplankton. Wynika to zapewne z faktu, że mikroorganizmy bytujące w biofilmie posiadają lepsze mechanizmy pozwalające na wykorzystanie węglowodorów aromatycznych jako źródła węgla oraz zabezpieczające przed toksycznym wpływem tych związków (co opisano wcześniej). Podobne sugestie przedstawili w swoich pracach Rao i wsp. [72], Walczak i wsp. [88]. Badacze ci przedstawili wyniki świadczące o dużych możliwościach rozkładu węglowodorów aromatycznych, zwłaszcza jednopierścieniowych przez bakterie wyizolowane z mikrowarstwy powierzchniowej. Podobnie Barbee i wsp. [3] wskazują na możliwość wykorzystania węglowodorów przez mikroorganizmy jako substratu pokarmowego tłumacząc, że duża aktywność degradacji węglowodorów jednopierścieniowych przez bakterioneuston może być wynikiem lepszego dostępu tlenu w mikrowarstwie powierzchniowej. Tlen bowiem jest niezbędny w początkowym etapie uaktywnienia cząsteczki węglowodoru. Podobne wyniki, świadczące o lepszej wydajności biodegradacji benzenu, toluenu i ksyleny przez szczepy mikrowarstwy powierzchniowej uzyskali Lichtfield i Floodgat [51], którzy również zaobserwowali większą aktywność degradacji węglowodorów frakcji BTX (benzen, toluen, ksylen) przez bakterioneuston. Ich zdaniem może być to spowodowane obecnością wśród bakterii neustonowych dużej grupy bakterii amylolitycznych, które są zdolne do niezwykle aktywnego rozkładu węglowodorów. Wyniki te wskazują więc na większą ilość szczepów potencjalnie zdolnych do przeprowadzania aktywnego rozkładu węglowodorów aromatycznych z dużą wydajnością w mikrowarstwie powierzchniowej. Podobnie Kim [43] stwierdził, że zdolność do rozkładu węglowodorów przez szczepy mikrowarstwy powierzchniowej jest dwa razy wyższa niż szczepów z głębszych warstw wody.

5. Podsumowanie

Na podstawie dotychczasowych badań mikroorganizmów zasiedlających warstwę błony powierzchniowej stwierdzono, że ogólna liczba bakterii jest zawsze więk-

sza w błonie powierzchniowej niż w wodzie podpowierzchniowej, jednak liczebność bakterii heterotroficznnych, bakterii „żywych” czy aktywnych metabolicznie jest już znacznie mniejsza i często porównywalna z tą w wodzie podpowierzchniowej. Aktywność metaboliczna i podziałowa pojedynczych komórek bakteryjnych w błonie powierzchniowej jest mniejsza niż bakterii planktonowych występujących w wodzie podpowierzchniowej. Z kolei skład rodzajowy bakterioneuston jest odmienny od szczepów bakterioplanktonu, ponadto w błonie powierzchniowej można wyróżnić szczepy dominujące i takie, których nigdy nie wyizolowano z wody podpowierzchniowej. Poważne różnice pomiędzy bakteriami neustonowymi a tymi z wody podpowierzchniowej stwierdzono także w odniesieniu do ich właściwości biochemiczno-fizjologicznych. W przypadku bakterioneuston właściwości te często odzwierciedlają skład chemiczny mikrowarstwy powierzchniowej i różnią się od właściwości bakterioplanktonu.

Pomimo tego, że w błonie powierzchniowej występuje olbrzymia masa mikroorganizmów, które znalazły się tam w sposób przypadkowy, to najprawdopodobniej warstwę tą zasiedla także wąska grupa szczepów bakteryjnych dotychczas niepoznanych, a wykazujących szczególne przystosowania i właściwości pozwalające im kolonizować to nietypowe środowisko.

Piśmiennictwo

1. Baier R.E.: Surface quality assesment of natural bodies of water. Proc. 13th Conf. Great Lakes Res., Int. Assoc. Great Lakes Res. 114–127 (1970)
2. Baier R.E., Goupil D.W., Perlmutter S, King R.: Dominant chemical composition of surface films, natural slick, and foams. *J. Rech. Atoms.* **8**, 571–600 (1974)
3. Barbee G.C., Brown K.W., Donnelly K.C.: Fate of motagen chemicals in soil amended with petroleum and wood presensing sludges. *Waste Management and Research*, **10**, 73–85 (1992)
4. Bartoosingh E., Riley G.A., Keshwar B.: An analysis of experimental methods for producing particulate organic matter in seawater by bubbling. *Deep Sea Res.* **16**, 213–219 (1969)
5. Baylor E.R., Sutcliffe W.H.: Dissolved organic matter in seawater as a source of particulate food. *Limnol. Oceanogr.* **8**, 369–375 (1963)
6. Bell C.R., Albright W.J.: Bacteriological investigation of the neuston and plankton in the Freser River Estuary. *British Columbia Estuar. Coast. Self. Sci.* **15**, 385–394 (1982)
7. Blanchard D.C., Syzdek L.D.: Seven problems in bubble and jet drop researches. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 389–400 (1978)
8. Boehm P.D.: Evidence for the decoupling of dissolved, particulate and surface microlayer hydrocarbons in northwestern Atlantic continental shelf waters. *Mar. Chem.* **9**, 255–281 (1980)
9. Bungay H.R., Masek R.D.: Estimation of thickness of bacterial films at an air-water interface. *Biotech. Bioengin.* **23**, 1155–1157 (1981)
10. Carty C., Colwell R.R.: A microbiological study of air and surface water microlayers in the open ocean. *J. Wash. Acad. Sci.* **65**, 148–153 (1975)

11. Cincinelli A., Stortini A.M., Pereguni M., Checchini L., Lepri L.: Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn (Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.* **76**, 77–98 (2001)
12. Cockell C.S.: Ultraviolet radiation and the photobiology of earth's early oceans. *Origins of Life and Evol. of the Biosph.* **30**, 467–499 (2000)
13. Crecelius E.A.: Measurements of oxidations in ozonized seawater and some biological reactions. *J. Fish Res. Board Can.* **36**, 1006–1008 (1979)
14. Crawford R.L., Johnson L., Martinson M.: Bacterial enrichments in surface films of freshwater lakes. *Great Lakes Res.* **8**, 323–325 (1982)
15. Dahlbäck B.: Marine microorganisms and interfaces. PhD dissertation, Univ. of Göteborg 1983
16. Danos S.C., Maki J.S., Remsen C.C.: Stratification of microorganisms and nutrients in the surface microlayer of small freshwater ponds. *Hydrobiologia*, **98**, 193–202 (1983)
17. Dumas R.A., Laborde P.L., Marty J.C., Saliot A.: Influence of sampling method on the chemical composition of water surface. *Limnol. Oceanogr.* **21**, 319–326 (1976)
18. De Souza Lima Y., Chretiennot-Dinet M.J.: Measurements of biomass and activity of neustonic microorganisms. *Est. Coast. Shelf Sci.* **19**, 167–180 (1984)
19. Di Salvo L.H.: Contamination of surfaces by bacterial neuston. *Limnol. Oceanogr.* **18**, 165–168 (1973)
20. Dojlido J.R.: Chemia wód powierzchniowych. WEiŚ, Białystok 1995
21. Donderski W., Walczak M., Mudryk Z.: Neustonic Bacteria of Lake Jeziorak Mały. *Pol. J. Environment. Stud.* **7**, 125–129 (1998)
22. Donderski W., Walczak M., Mudryk Z., Skórczewski P.: The influence of heavy metal ions on neustonic bacteria. *Baltic Coastal Zone*, **3**, 53–64 (1999)
23. Donderski W., Walczak M., Mudryk Z., Kobyliński M.: Neustonic bacteria number, biomass and taxonomy. *Pol. J. Environment. Stud.* **8**, 137–141 (1999)
24. Edwards C.: Introduction. (w:) *Microbiology of Extreme Environments*, red. Edwards C., McGraw-Hill, New York, 1990, s. IX–XI.
25. Erickson D.J., Zepp R.G., Atlas E.: Ozone depletion and the air-sea exchange of greenhouse and chemically reactive trace gases. *Chemosphere-Global Change Science*, **2**, 137–149 (2000)
26. Falkowska L.: Mikrowarstwa powierzchniowa morza. Uniwersytet Gdański s. 189 (1996)
27. Garabetian F.: ¹⁴C-glucose uptake and ¹⁴C-CO₂ production in surface microlayer and surface-water samples: influence of UV and visible radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**, 21–26 (1991)
28. Garland J.A., Elzerman A.W., Penkett S.A.: The mechanism for dry deposition of ozone to seawater surfaces. *J. Geophys. Res.* **85**, 7488–7492 (1980)
29. Garrett W.D.: The organic chemical composition of ocean surface. *Deep Sea Res.* **14**, 221–227 (1967)
30. Garrett W.D.: Impact of natural and man-made surface films on the properties of the air-sea interface. (w:) *The Changing Chemistry of the Oceans*, Nobel Symposium 20, red. Dyrssen D., Jagner D., Almqvist & Wiksell, Stockholm 1972, s. 75–91
31. Geesey G.G., Jang L.: Interactions between metal ions and capsular polymers. (w:) *Metal Ions and Bacteria*, red. Beveridge T.J., Doyle R.J., John Wiley & Sons, New York 1989, s. 325–357
32. Guerin W.F.: Phenantrene degradation by estuarine surface microlayer and bulk water microbial populations. *Microb. Ecol.* **17**, 89–104 (1989)
33. von Gunten U., Hogine J.: Ozonation of bromide-containing waters. Bromate formation through ozone and hydroxyl radicals. (w:) *Disinfection by-products in water treatment*, red. Minear R.A., Amy G.L., CRC Press Inc. Boca Raton, 1996 s. 187–206
34. Gustafsson K., Norkrans B.: Interference of a guetenary amine in interfacial at bacterial cellulolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**, 235–239 (1983)
35. Häder D.P., Kumar H.D., Smith R.C., Worrest R.C.: Effects on aquatic ecosystems. *J. Photochem. Photobiol.* **46**, 53–68 (1998)
36. Hardy J.T.: The sea surface microlayer: Biology, chemistry and anthropogenic enrichment. *Prog. Oceanogr.* **11**, 307–328 (1982)
37. Hardy J.T., Apts C.W., Crecelius E.A., Bloom N.S.: Sea-surface microlayer metals enrichments in an urban and rural bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **20**, 299–312 (1995)
38. Harvey R.W., Young L.Y.: Enrichment and association of bacteria and particulates in the salt marsh surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 894–899 (1980)
39. Hermansson M., Dahlbäck B.: Bacterial activity at the air/water interface. *Microbiol. Ecol.* **9**, 317–328 (1983)
40. Hessen D.O., Gjessing E.T., Knulst J., Fjeld E.: TOC fluctuations in humic lake as related to catchment acidification, season and climate. *Biogeochemistry*, **36**, 139–151 (1997)
41. Jones G.W., Baines L., Genthner F.J.: Heterotrophic bacteria on the freshwater neuston and their ability to act as plasmids recipients under nutrient deprived conditions. *Microb. Ecol.* **22**, 15–25 (1991)
42. Kim S.J.: Effect of heavy metals on natural populations of bacteria from surface microlayer and subsurface water. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **26**, 203–206 (1985)
43. Kjelleberg S., Norkrans B., Löfgren H., Larsson K.: Surface balance study of the interaction between microorganisms and lipid monolayer at the air/water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 609–611 (1976)
44. Kjelleberg S., Stenström T., Odham G.: Comparative study of different hydrophilic devices for sampling lipid surface films and adherent microorganisms. *Mar. Biol.* **53**, 21–25 (1979)
45. Kjelleberg S., Stenström T.A.: Lipid surface films: interaction of bacteria with free fatty acids and phospholipids at the air/water interface. *J. Gen. Microbiol.* **116**, 417–423 (1980)
46. Kostrzewa-Szlakowska I.: Air-water interface in lakes: relations to in-lake trophism. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **27**, 1871–1874 (2000)
47. Kunicki-Goldfinger W.: *Życie bakterii*. PWN, Warszawa 1998
48. Lampert W., Sommer U.: *Ekologia wód śródlądowych*. PWN, Warszawa 2001
49. Larsson K., Odham G., Södergren A.: On lipid surface films on the sea. Simple method for sampling and studies of composition. *Mar. Chem.* **2**, 49–57 (1974)
50. Leahy G., Colwell R.R.: Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305–309 (1990)
51. Lichtfield C., Floodgate G.: Biochemistry and microbiology of some Irish Sea sediments. Bacteriological analysis. *Mar. Biol.* **30**, 97–103 (1975)
52. Lion L.W., Leckie J.O.: Accumulation and transport of Cd, Cu and Pb in an estuarine salt marsh surface microlayer. *Limnol. Oceanogr.* **27**, 111–125 (1981)
53. MacIntyre F.: The top millimeter of the ocean. *Sci. Am.* **62**, May (1974)
54. Maki J.S.: The air-water interface as an extreme environment. (w:) *Aquatic Microbiology, An ecological approach*, red. Edgcombe T.F., Blackwell Sci. Publ. Boston, 1993 s. 409–440

55. Maki J., Herwig R.: A diel study of the neuston and plankton bacteria in an Antarctic ponds. *Antarc. Sci.* **3**, 47–51 (1991)
56. Maki J.S., Remsen C.C.: Examination of a freshwater surface microlayer for diel changes in the bacterioneuston. *Hydrobiologia*, **182**, 25–34 (1989)
57. Marshall K.: Bacterial adhesion in oligotrophic habitats. *Microbiol. Sci.* **2**, 65–118 (1985)
58. Marty J.C., Zutic V., Precali R., Saliot A., Cosovic B., Smodlaka N., Cauwet G.: Organic matter characterization in the northern Adriatic Sea with special reference to the sea surface microlayer. *Mar. Chem.* **25**, 243–263 (1988)
59. Marumo R., Tuga N., Nakai T. Neustonic bacteria and phytoplankton in surface microlayers of the equatorial waters. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **18**, 36–41 (1971)
60. McDowell R.S., McCutchen C.W.: The Thoreau-Reynolds Ridge, a lost and found phenomenon. Academic Press, London (1971)
61. McIntyre W.G., Smith C.L., Munday J.C., Gibson V.M., Lake J.L., Windsor J.G., Dupuy J.L., Harrison W., Obserholzer J.D.: Investigation of surface films – Chesapeake Bay entrance. US Environ. Prot. Agency Ser. EPA-670/2-73-099, 1974
62. Moris B. F., Butler J.N., Zsolnay A.: Pelagic tar in the Mediterranean Sea, 1974–1975. *Environ. Conserv.* **2**, 275–281 (1975)
63. Mudryk Z., Korzeniewski K., Falkowska L.: Bacteriological investigation of the surface microlayer of the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia*, **30**, 93–103 (1991)
64. Mudryk Z., Donderski W., Skórczewski P., Walczak M.: Effect of some heavy metals on neustonic and planktonic bacteria isolated from the deep of Gdańsk. *Oceanological Studies*, **1**, 89–99 (2000)
65. Nasim A., James A.P.: Life under conditions of high irradiations. (w:) *Microbial life in extreme environments.*, red. Kushner D.J., Academic Press, London 1978 s. 409–439
66. Naumann E.: Beiträge zur Kenntnis des Teichnannoplankton. II. Über das Neuston des Süßwassers. *Biol. Zentralbl.* **37**, 98–106 (1917)
67. Niewolak S.: A microbiological study on the hyponeuston of the Iława lakes in the summer season. *Acta Hydrobiol.* **13**, 295–311 (1971)
68. Norkrans B.: Surface microlayers in aquatic environments. *Adv. Microb. Ecol.* **4**, 51–85 (1980)
69. Norkrans B., Sorensson F.: On the marine lipid surface microlayer-bacterium accumulation in model systems. *Botanica Marina*, **20**, 473–478 (1977)
70. Passman F.J., Novitsky T.J., Watson S.W.: Surface microlayers of the North Atlantic: microbial populations, heterotrophic and hydrocarbonoclastic activities. (w:) *Proc. Workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments.*, red. Bourquin A.W., Pritchard P.H., US EPA, Gulf Breeze, Florida 1979, s. 214–226
71. Rambeloarisoa E.: Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from seasurface foams. *Mar. Biol.* **83**, 69–81 (1984)
72. Rao P.S.C., Bellin C.A., Brusseau M.L.: Coupling biodegradation of organic chemical to sorption and transport in soil and aquifers: paradigms and paradoxes. *Soil Sci. Society of America and American Society of Agronomy, Special Publication no. 12*, 1993
73. Romano J.C.: Les populations bacteriennes a l'interface air-mer. (w:) *Micro-Organismes dans les Ecosystemes Oceaniques.*, red. Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., Caumetta P. & Gauthier M., Mason, Paris, 1989, s. 153–184
74. Schmidt-Nielsen.: Beitrag zur Biologie der marinen Bakterien. *Biol. Zentralbl.* **21**, 65–71 (1901)
75. Shilo M.: Introduction. (w:) *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments.*, red. Shilo M., Verlag Chemie, Berlin, 1979, s. 11–13
76. Sieburth J.: The influence of algal antibiotics on the ecology of marine microorganisms. (w:) *Advances in microbiology of the sea.*, red. Droop M.R., Wood E.J.F., Academic Press, London, 1968, s.
77. Sieburth J., Willis P.J., Johnson P.W., Davis P.G.: Dissolved organic matter and heterotrophic microneuston in the surface microlayers of the North Atlantic. *Science*, **194**, 1415–1418 (1976)
78. Sieburth J.: Microbiological and organic-chemical processes in surface and mixed layers. (w:) *Air-Sea Exchange of Gases and Particles.*, red. Liss P.S. & Slinn W.G.N., D. Reidel, Hindgham, 1983, s. 121–172.
79. Singer C.E., Ames B.N.: Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. *Science*, **170**, 822–826 (1970)
80. Skórczewski P., Mudryk Z.: Dynamics of daily changes to the number and production of estuarine bacterioneuston and bacterioplankton. *AUMC, Limnological Papers*, **23**, 55–63 (2003)
81. Smith K.C., Sargentini N., J.: Metabolically-produced “UV-like” DNA damage and its role in spontaneous mutagenesis. *Photochem. Photobiol.* **42**, 801–803 (1985)
82. Södergren A., Larson P., Knulst J., Bergqvist C.: Transport of incinerated organochlorine compounds to air, water, microlayer, and organisms. *Mar. Pollut. Bull.* **21**, 18–24 (1990)
83. Stürmeyer H., Overmann J., Babenzien H.D., Cypionka H.: Ecophysiological and phylogenetic studies of *Nevskia ramosa* in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1890–1894 (1998)
84. Summers A.O., Barkay T.: Metal resistance genes in the environment. (w:) *Gene Transfer in the Environment.*, red. Levy S.B. & Miller R.V., McGraw-Hill, New York 1989, s. 287–308
85. Sutcliffe W.H., Baylor E.R., Menzel D.W.: Sea surface chemistry and Langmuir circulation. *Deep-Sea Res.* **10**, 233–239 (1963)
86. Upton A. C., Nedwell D.B., Wynn-Williams D.D.: The selection of microbial communities by constant or fluctuating temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**, 243–252 (1991)
87. Vestal J.R., Hobbie J.E.: Microbial adaptations to extreme environments. (w:) *Microorganisms in Action: Concepts and Applications in Microbial Ecology.*, Lynch J.M., Hobbie J.E., Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1988, s. 193–206
88. Walczak M., Donderski W., Mudryk Z., Skórczewski P.: Aromatic hydrocarbons decomposition by neustonic bacteria. Part I. Single-ring hydrocarbons biodegradation. *Pol. J. Environ. Studies*, **9**, 471–474 (2000)
89. Walczak M., Donderski W.: Changes in the number of neustonic bacteria over 24 hours. *AUNC, Limnological Papers*, **23**, 65–79 (2003)
90. Walczak M., Donderski W.: Decomposition of anionic surface active substances by bacteria from the surface microlayer of lake Jeziorak Mały. *Pol. J. Environ. Studies*, **13**, 325–331 (2004)
91. Williams P. M., Carlucci A.F., Henrichs S.M., Van Vleet E.S., Horrigan S.G., Reid F.M.H., Robertson K.J.: Chemical and microbiological studies of sea-surface films in the southern Gulf of California and off the west coast of Baja California. *Mar. Chem.* **19**, 17–98 (1986)
92. Wurl O., Obbard J.P., A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat of marine organisms. *Mar. Poll. Bulletin*, **48**, 1016–1030 (2004)
93. Zaitsev Y.P.: Marine Neustonology. Israel Prog. Scientific Tranl. Jerusalem, 1971

Stanisława Tylewska-Wierzbanowska, Tomasz Chmielewski

Państwowy Zakład Higieny, Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzcących
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 022-5421250, e-mail: stylewska@pzh.gov.pl

Wpłynęło w

1. Wprowadzenie. 2. Swoiste antygeny *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 3. Postępowanie diagnostyczne. 3.1. Metoda EIA. 3.2. Western-blot. 3.3. Inne badania. 4. Podsumowanie

Serological diagnosis of Lyme borreliosis – European guidelines

Abstract: Lyme disease is a multisystem and multistage infection caused by three genospecies of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato species. The diagnosis of Lyme disease is based on the history of tick-bite, physical examination and laboratory tests, which confirmed clinical recognition. In 2000 the German Society of Hygiene and Microbiology (DGHM) has published guidelines for the microbiological diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. It has been established that two-step diagnosis warranted highest specificity and sensitivity. At the first step level of *B. burgdorferi* antibodies is measured with screening test such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or indirect fluorescent-antibody assay (IFA). At the second step specificity of positive or equivocal results is confirmed with immunoblot. For each genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as the blot antigen, different interpretation criteria for positive Western-blot are recommended.

1. Introduction. 2. Specific antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 3. Diagnostic protocol. 3.1. EIA. 3.2. Western-blot. 3.3. Others methods. 4. Summary

Słowa kluczowe: borelioza z Lyme, rozpoznanie, *Borrelia burgdorferi*, ELISA, Western-blot

Key words: Lyme borreliosis, recognition, *Borrelia burgdorferi*, ELISA, Western-blot

1. Wprowadzenie

Borelioza z Lyme jest wieloukładową chorobą zakaźną przenoszoną przez kleszcze. Zakażenie to ma charakter postępującej choroby, w której można wyodrębnić kolejne jej stadia. We wczesnej fazie (I stadium), po kilku dniach lub tygodniach od chwili zakażenia, pojawia się rumień wędrujący, któremu mogą towarzyszyć objawy grypopodobne. W II stadium dochodzi do zakażenia wielu narządów i układów; pojawiają się dolegliwości ze strony ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego, układu kostno-stawowego lub układu krążenia. Późna borelioza z Lyme charakteryzuje się nieodwracalnymi zmianami stawowymi, uszkodzeniem układu nerwowego w postaci encefalopatii lub uszkodzeniem nerwów czaszkowych, obwodowych, a także przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry. Wielopostaciowość choroby wymaga diagnostyki różnicowej i często sprawia trudności w prawidłowym rozpoznaniu [30, 31].

Dla ułatwienia identyfikacji zakażeń jak i dla celów epidemiologicznych wprowadzono definicję przypadku boreliozy z Lyme. Pierwszą definicję sformułowano w 1991 roku w USA. Obejmowała ona chorych z rumieniem wędrującym oraz chorych z co najmniej jednym objawem boreliozy późnej i potwierdzeniem rozpoznania klinicznego badaniem laboratoryjnym [3, 29]. Europejska definicja wprowadzona w 1996 roku jest szersza niż amerykańska ze względu na występowanie w Europie, co najmniej trzech chorobotwórczych dla człowieka genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato, tj. *B. burgdorferi* sensu

stricto, *B. garini* oraz *B. afzeli* i związane z tym większe zróżnicowanie objawów choroby. W Ameryce Północnej stwierdza się obecność wyłącznie *B. burgdorferi* sensu stricto [34].

Najczęściej w Europie występują *B. garini* i *B. afzeli*, podczas gdy *B. burgdorferi* sensu stricto znacznie rzadziej i zwykle w Europie wschodniej. Zróżnicowanie szczepów wywołujących zakażenia na naszym kontynencie powinno być brane pod uwagę przy opracowywaniu nowych testów diagnostycznych typu PCR jak i antygenów diagnostycznych do badań serologicznych. Należy także pamiętać, że w Europie stwierdzono obecność genogatunków, których chorobotwórczość nie została dotychczas potwierdzona, ale również nie została wykluczona, jak np. *B. valaisiana* i szczepy należące do nienazwanego jeszcze genogatunku A14S. W prawidłowo prowadzonej diagnostyce, test PCR powinien wykrywać również ich sekwencje.

Podstawą rozpoznania boreliozy z Lyme jest obecność określonych objawów klinicznych, potwierdzonych badaniem laboratoryjnym, wykrywającym swoiste przeciwciała klasy IgM i/lub IgG dla *B. burgdorferi*.

2. Swoiste antygeny *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Swoiste dla *B. burgdorferi* białka, które mogą być wykorzystane jako antygeny diagnostyczne charakteryzują się znaczną heterogennością. Występujące w Europie trzy chorobotwórcze dla człowieka genogatunki można podzielić na przynajmniej siedem serotypów, ze względu na zróżnicowanie białek OspA.

W trzech standardowych szczepach (B31, Pko i Pbi), należących do trzech różnych genogatunków, oznaczono zgodność sekwencji aminokwasów w białkach OspC i Osp17, która jak się okazało wynosi zaledwie 54–68% i 40–44% [35]. Jednym z najbardziej immunogennych białek w komórce *B. burgdorferi* jest flagelina, białko wchodzące w skład wici. Wywołuje ono silną i wczesną odpowiedź humoralną. Flagelina, w początkowym i końcowym odcinku łańcucha, wykazuje wysoki stopień homologii sekwencji aminokwasów z sekwencją flageliny *Bacillus subtilis* (65%) i *Salmonella* Typhimurium (56%) [33]. Epitopy charakterystyczne dla gatunku *B. burgdorferi* zlokalizowane są tylko między 129 a 251 aminokwasem [9]. Ponadto końcowa sekwencja tego polipeptydu wykazuje aż 80% homologii z białkiem flageliny *Treponema pallidum* [8]. W celu zwiększenia swoistości testów serologicznych, doprowadzono w wyniku rekombinacji, do skrócenia łańcucha tego białka w celu uzyskania polipeptydu z epitopami charakterystycznymi tylko dla *B. burgdorferi*. Wyprodukowano w ten sposób rekombinowany fragment flageliny między 197 a 241 aminokwasem o masie 14 kDa.

Białka błony zewnętrznej są lipoproteinami o zmiennej masie cząsteczkowej: OspA (31–32 kDa), OspB (33–36 kDa) i OspC (21–22 kDa) [36, 39], które charakteryzują się dużą swoistością. Białko OspA wykazuje różnice w sekwencji aminokwasów pomiędzy 30 i 101 aminokwasem. Na tej podstawie wyodrębniono dotychczas 7 serotypów występujących na terenie Europy i Ameryki Płn. Odpowiadają one podziałowi na genogatunki: *B. burgdorferi* sensu stricto – serotyp 1, *B. afzelii* – serotyp 2, *B. garini* – serotypy od 3 do 7 [37]. W przypadku białka OspC, na podstawie różnic w sekwencji aminokwasów, wyodrębniono dotychczas 4 serotypy krętków [38]. Jest to białko wysoce immunogenne, odpowiedzialne przede wszystkim za wczesną odpowiedź humoralną.

W diagnostyce czasami wykorzystywana jest także obecność wysoce konserwatywnych, a jednocześnie immunogennych epitopów w heterogennych białkach, jak np. peptyd C6 w białku VlsE [14].

3. Postępowanie diagnostyczne

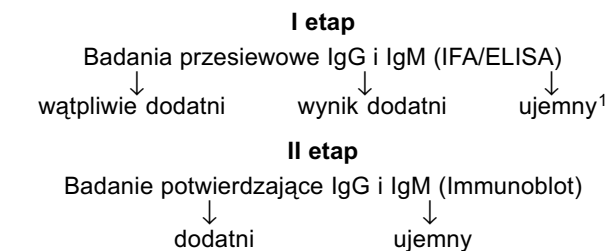
3.1. Metoda EIA

Prawidłowe rozpoznanie boreliozy z Lyme uwarunkowane jest odpowiednim doбором metod serologicznych i antygenów diagnostycznych oraz poprawną interpretacją otrzymanych wyników [35].

W 2000 roku opublikowano, opracowane przez międzynarodową grupę ekspertów, zalecenia dotyczące prawidłowej diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme (angielska wersja „MiQ 12 Lyme Borreliose” dostępna w internecie).

Ze względu na liczne nieswoiste reakcje krzyżowe i fałszywie dodatnie wyniki [8], których nie można było wyeliminować w powszechnie stosowanych testach ELISA, mimo wprowadzania różnych antygenów diagnostycznych (sonikat całej komórki, izolowane białka, antygeny rekombinowane), zalecana jest obecnie dwustopniowa diagnostyka serologiczna. Polega ona na oznaczeniu w pierwszym etapie poziomu przeciwciał półilościowymi testami serologicznymi o wysokiej czułości (np. IFA lub ELISA). Następnie, próbki surowic, z którymi uzyskano wynik dodatni lub wątpliwie dodatni są badane jakościową metodą Western-blot o wysokiej swoistości, w celu weryfikacji wcześniejszych rezultatów. Interpretacja wyników badań EIA i Western-blot odbywa się według ściśle ustalonych kryteriów (Rys. 1).

Jednostopniowa diagnostyka boreliozy jest częstą praktyką stosowaną w polskich laboratoriach. Powszechnie wykorzysty-



¹ należy zakończyć.

Jeżeli mimo ujemnego wyniku nadal klinicznie podejrzewane jest zaawansowane stadium boreliozy można zastosować inne dodatkowe metody diagnostyczne.

Rys 1. Schemat dwu-etapowego postępowania diagnostycznego w kierunku boreliozy z Lyme

wane testy ELISA są czułe, proste w wykonaniu, gwarantują szybkie uzyskanie wyniku nie podlegającego subiektywnym ocenom badacza. Niestety ich niska swoistość, wynosząca 29–71% w zależności od zastosowanego antygeny [19], może prowadzić do błędnych rozpoznań.

Dostępne testy ELISA różnią się między sobą głównie antygenem diagnostycznym. Może nim być cała komórka bakteryjna, stosowana w metodach immunoenzymatycznych w formie sonikatu lub cała, nienaruszona komórka w odczynie immunofluorescencji (pierwsza generacja testów).

Testy ELISA stosowane w badaniach przesiewowych powinny należeć przynajmniej do drugiej generacji, ponieważ w grupie tej została udoskonalona swoistość i w dużym stopniu zostały ograniczone krzyżowe reakcje. Do tej grupy należą testy, w których albo antygenem diagnostycznym są izolowane frakcje białek albo stosowana jest wstępna absorpcja krętkami Reitera. Szczepy używane do produkcji antygeny muszą wytwarzać białko OspC umożliwiające wykrycie swoistej odpowiedzi w klasie IgM i OspA (DbpA), a jednocześnie będące dominującym antygenem w odpowiedzi IgG.

W najnowszej, trzeciej generacji testów, jako antygeny diagnostyczne stosowane są rekombinowane białka. Dotychczas otrzymano i sprawdzono pod względem przydatności w diagnostyce boreliozy z Lyme, białka p83/100 (wskaźnik późnej fazy choroby), p41 (flagelina, p41int (wewnętrzna część cząsteczki flageliny o masie 14 000, nie reagująca krzyżowo z flageliną innych gatunków bakteryjnych), białka błony zewnętrznej OspA i OspC i p39. Ostatnie badania wskazują, że uzupełnienie antygeny diagnostycznego o rekombinowane białka p17 i p58, a także p14, p30, p43 może znacznie zwiększyć czułość testu [35].

W każdym przypadku, powinny być oznaczone przeciwciała obu klas. Uzyskanie ujemnego wyniku badania serologicznego we wczesnej fazie zakażenia nie przesądza o rozpoznaniu.

Zalecane jest powtórzenie badania z nową próbką surowicy po upływie 4 tygodni od wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Należy także pamiętać, że swoiste przeciwciała wykrywane są także u osób zdrowych, co może świadczyć o bezobjawowym przebiegu choroby. W zależności od stopnia narażenia na kontakt z kleszczami odsetek osób z przeciwciałami wynosi od 12% w normalnej populacji (krwiodawcy) do około 40% w grupach ryzyka np. wśród leśników [6, 7]. Obecność samych przeciwciał, bez objawów zakażenia, nie może być wskazaniem do leczenia.

3.2. Western blot

Pierwsze kryteria oceny wyniku badania metodą Western-blot ustalone zostały przez Center for Disease Control and Prevention (CDC) w Atlancie, USA [3]. Interpretacja uzyskanych wyników

zgodnie z tymi kryteriami jest często zalecana przez producentów testów i nie rzadko automatycznie stosowana na kontynencie europejskim. Może to prowadzić do błędów w rozpoznaniu.

Opracowanie kryteriów oceny wyników badań metodą Western-blot przeprowadzonych u chorych z terenu Europy jest bardziej złożone ze względu na występowanie kilku genogatunków chorobotwórczych na obszarze tego kontynentu.

Analiza występowania przeciwciał przeprowadzona w ramach programu EUCALB, wykazała przydatność następujących 8 antygenów w diagnostyce zakażeń *B. burgdorferi* sensu lato: OspC i p41 dla IgM oraz p83/100, p58, p41, p39, OspC, p17 dla IgG, jakkolwiek wykazano zróżnicowane ich znaczenie. Stwierdzono, bowiem że czułość i swoistość metody zależna jest od genogatunku szczepu użytego jako antygen diagnostyczny. Ważnym elementem jest zastosowanie kryteriów uwzględniających odpowiedź immunologiczną na antygeny szczepów najczęściej występujących na danym terenie. Ponadto, przyjęta interpretacja wyników powinna być również powiązana z charakterystyką objawów klinicznych stwierdzanych na danym terenie [24].

Aby poprawnie zinterpretować wynik badania, potrzebna jest informacja na temat czasu trwania choroby, z którym ściśle związane jest pojawienie się przeciwciał dla określonych antygenów. We wczesnej boreliozie znaczenie ma intensywność przynajmniej dwóch frakcji białkowych (p41 i OspC) i w związku z tym konieczne jest stosowanie odpowiednich kontroli wewnętrznych, aby ocenić badanie półilościowo.

Dostępne są testy, w których rozdzielności poddano albo lizat całej komórki albo wyselekcjonowane białka *B. burgdorferi* produkowane w wyniku manipulacji genetycznych, przez komórki *E. coli*.

Zaletą lizatu całej komórki jest możliwość wykrycia większej liczby immunogennych frakcji. Wadą natomiast to, że w niektórych przypadkach trudno jest rozróżnić frakcje swoiste od krzyżowo reagujących.

Stosując antygeny rekombinowane istnieje pewność, że uzyskane reakcje dotyczą wyłącznie swoistych białek. Ponadto, możliwe jest zastosowanie w jednym teście swoistych białek pochodzących z różnych genogatunków, a także swoistych peptydów będących fragmentami białek, które w całości wywołują reakcje krzyżowe, jak np. białko p41 i peptyd p41 int. Mimo tych zalet i porównywalnej swoistości rekombinowany immunoblot nie ma czułości, jaką wykazuje immunoblot z lizatem całej komórki. Ponadto konieczna jest kontrola swoistości z surowicami odpornościowymi dla *E. coli*.

W związku z tym wydaje się, że zastosowanie jako antygen diagnostyczny w metodzie immunoblot, szczepu, który wytwa-

rza swoiste, immunogenne białka jest najbardziej racjonalne. Konieczna jest jednak dokładna standaryzacja testu i bardzo precyzyjna indentyfikacja frakcji białkowych przy pomocy przeciwciał monoklonalnych.

Największą czułością charakteryzuje się Western-blot z antygenami *B. afzelii* (szczep PKo) i dlatego jest on zalecany w diagnostyce na terenie Europy [10].

Przyjmuje się, że jeżeli antygenem jest szczep *B. afzelii* to wynik immunoblot jest dodatni jeżeli przeciwciała IgM reagują przynajmniej z jedną frakcją z pośród: p41 (silna reakcja), p39, OspC, DbpA (Osp17). Wraz ze zmianą antygeny diagnostycznego zmieniają się również kryteria interpretacji (patrz Tabela I).

3.3. Inne badania

Podstawą rozpoznania laboratoryjnego boreliozy z Lyme są badania serologiczne. Opiswane są jednak serologicznie ujemne przypadki choroby. Przyczyna tego zjawiska nie jest wyjaśniona, między innymi tłumaczy się to możliwością powstawania kompleksów immunologicznych [27]. W związku z tym, jeżeli mimo ujemnego wyniku nadal klinicznie podejrzewane jest zaawansowane stadium boreliozy, można zastosować inne dodatkowe metody diagnostyczne, jak np. PCR lub hodowlę itp. Mają one także zastosowanie u chorych z nietypowym rumieniem wędrującym, przy podejrzeniu wczesnej neuroboreliozy, w której nie zostały jeszcze wytworzone przeciwciała oraz u chorych z obniżoną odpornością.

3.3.1. PCR. Łącuchowa reakcja polimerazy umożliwia wielokrotne powielanie określonych, charakterystycznych dla danego drobnoustroju fragmentów genomu. W przypadku *B. burgdorferi* sensu lato, najczęściej wykrywane są sekwencje genów kodujących flagelinę, białka błony zewnętrznej (Osp), 16S-RNA i 5S-23S-RNA [11, 15, 17, 18, 21, 23]. PCR jest metodą bardzo czułą, a dolna granica wykrywalności wynosi około 10–1000 komórek w badanej próbce [16, 20]. Pomimo swych niewątpliwych zalet posiada jednak szereg ograniczeń. Do najważniejszych należy rodzaj materiału do badania i stadium choroby, w którym został pobrany. Materiał genetyczny krętków częściej można wykryć w ostrej fazie choroby, niż w jej okresie przewlekłym. DNA krętków wykrywa się w około 60–70% wycinków skóry pobranych z rumienia wędrującego i w około 60% wycinków ze zmian typu ACA [26, 28, 32]. U chorych z rumieniem wędrującym DNA *B. burgdorferi* we krwi stwierdza się nie częściej niż u około 18% u chorych [26]. W płynie mózgowo-rdzeniowym DNA wykrywa się w 38% przypadków w neuroboreliozie wcze-

Tabela I
Kryteria dodatniego wyniku Western-blot, uwzględniające antygeny genogatunków występujących w Europie

Genogatunek*	Wykrywane frakcje przeciwciał w klasie:	
	IgM	IgG
<i>B. afzelii</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC, p17 lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej dwie frakcje z: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17, p14
<i>B. garini</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej jedna frakcja z: p83/100, p39, p30, OspC, p21, p17
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC, p17 lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej jedna frakcja z: p83/100, p58, p56, OspC, p21, p17
Antygeny rekombinowane	Co najmniej dwie frakcje z: p39, OspC, p41 int., p17 lub silna reakcja z antygenem OspC	Co najmniej dwie frakcje z: p83/100, p58, p39, OspC, p41 int., p17

* genogatunek, z którego przygotowano antygen diagnostyczny

snej i w 25% w neuroboreliozie późnej [17]. W zależności od stosowanych starterów czułość metody PCR w płynie stawowym wynosi od 48% dla starterów komplementarnych do sekwencji genu 16S rRNA do 96% dla starterów dla OspA [18]. Na wynik badania może mieć wpływ obecność w badanym materiale DNA pochodzącego z komórek gospodarza, jak i hamujący wpływ innych składników tkankowych takich jak hemoglobina, heparyna, porfiryny. Ograniczenia te mogą prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich jak i fałszywie ujemnych. Poważny wpływ na otrzymany wynik mają też metody ekstrakcji DNA, gdyż ze względu na niewielką liczbę bakterii w badanym materiale może dochodzić do strat prowadzących do fałszywie ujemnego wyniku [1, 26]. Ponadto startery zastosowane do reakcji muszą umożliwiać amplifikację fragmentów DNA charakterystycznych dla wszystkich chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato z tą samą czułością.

3.3.2. Hodowla. Do hodowli krętków *B. burgdorferi* stosowane jest bardzo bogate podłoże BSK (Barbour'a, Stoener'a, Kelly'ego) i jego różne modyfikacje, najczęściej podłoże BSK w skład którego wchodzi ponad 60 składników, takich jak aminokwasy, witaminy, elektrolity; dodatkowo jest wzbogacane surowicą króliczą (6%) [2, 22]. Inokulum nie może być mniejsze niż 10 komórek bakteryjnych. Gęstość zawiesiny bakteryjnej w podłożu BSK-H po inkubacji 14 dni nie przekracza 10^{10} komórek w 1 ml, a czas między podziałami komórkowymi wynosi około 12 godzin. Na podłożach stałych bakterie te rosną jeszcze wolniej [2, 12, 22].

Krętki *B. burgdorferi* izolowane są ze zmian skórnych (biopaty), płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu stawowego i krwi. Najczęściej dodatnie posiewy uzyskuje się z biopłatów skóry pobranych z rumienia (ok. 50–85%) [28], rzadziej z płynu mózgowo-rdzeniowego (ok. 10%), z chrząstki stawowej; najmniej izolacji uzyskuje się z płynu stawowego i krwi [13, 25, 26]. *B. burgdorferi* są bakteriami powoli rosnącymi na dostępnych obecnie sztucznych podłożach bakteriologicznych, dlatego wynik hodowli można otrzymać nie wcześniej niż po 3 miesiącach inkubacji [13, 28]. Optymalna temperatura wzrostu krętków przy obniżonym poziomie tlenu wynosi 32–37°C [2, 22].

3.3.3. Hodowla i PCR. W porównaniu z zakażeniami innymi drobnoustrojami, liczba krętków w dostępnych do badania próbkach materiału klinicznego jest bardzo mała, na granicy wykrywalności metodą PCR. Ocenia się, że w płynie mózgowo-rdzeniowym liczba tych drobnoustrojów nie przekracza 50 komórek w 1 mL [13], i uzyskanie wystarczającej ilości DNA krętków do amplifikacji metodą PCR jest często niemożliwe. Istnieje możliwość wykonania posiewu, a następnie po inkubacji przez 1–2 tygodnie, poszukiwania DNA *B. burgdorferi* sensu lato metodą PCR. Szczególnie jest to ważne w przypadkach klinicznego rozpoznania neuroboreliozy przy słabej odpowiedzi immunologicznej lub jej braku. Taki sposób postępowania z materiałem klinicznym, podnosi znacznie czułość badania diagnostycznego w kierunku boreliozy [5].

4. Podsumowanie

Borelioza z Lyme jest najczęściej występującą w Europie i w Ameryce Północnej chorobą zakaźną przenoszoną przez kleszcze. Wielopostaciowość choroby często sprawia trudności w prawidłowym rozpoznaniu. Uwarunkowane jest ono odpowiednim doborem metod serologicznych i antygenów diagnostycznych oraz poprawną interpretacją otrzymanych wyników.

Zalecana jest obecnie diagnostyka dwustopniowa polegająca na oznaczeniu w pierwszym etapie poziomu przeciwciał półilościowymi testami serologicznymi o wysokiej czułości (np. IFA lub ELISA), a następnie, na weryfikacji wyników dodatnich lub wątpliwie dodatnich jakością metodą Western-blot. Interpretacja Western-blotu powinna uwzględniać ustalone kryteria przyjęte dla antygenów użytych szczepów.

Piśmiennictwo

1. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J.: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495–503 (1990)
2. Callister S.M., Case K.L., Agger W.A., Schell R.F., Johnson R.C., Ellington J.L.E.: Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoener-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 363–365 (1990)
3. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for public health surveillance. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* **39** (RR-13), 19–21 (1990)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the second national conference on serologic diagnosis of Lyme disease. *Morbid. Mortal. Weekly. Rep.* **44**, 590 (1995)
5. Chmielewski T., Fielt J., Gniadkowski M., Tylewska-Wierzbanowska S.: Improvement to laboratory recognition of Lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol. Diagn.* **7**, 155–162 (2003)
6. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Występowanie przeciwciał swoistych dla *Borrelia burgdorferi* u ludzi zdrowych na terenie Polski. *Przegl. Epidemiol.* **56**, 33–38 (2002)
7. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and HGE antibodies in forest workers in Poland. IX Intern. Conf. on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases. 18–22.08.2002. New York, USA.
8. Coleman J.L., Benach J.L.: Charakterization of antigenic determinants of *Borrelia burgdorferi* shared by other bacteria. *J. Infect. Dis.* **165**, 658–666 (1992)
9. Coleman J.L., Benach J.L.: Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Invest.* **84**, 322–330 (1989)
10. Hauser U., Lehnert G., Lobentanz R., Wilske B.: Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Clin. Microbiol.* **35** 1433–1444 (1997)
11. Johnson B.J.B., Happ C.M., Mayer L.W., Piesman J.: Detection of *Borrelia burgdorferi* in ticks by species-specific amplification of the flagellin gene. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**, 730–741 (1992)
12. Kurti T.J., Munderloch U.G., Johnson R.C., Ahlstrand G.G.: Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 2054–2058 (1987)
13. Lebech A.-M., Hansen K.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1646–1653 (1992)
14. Liang F.T., Aberer E., Cinco M., Gern L., Hu C.M., Lobet Y.N., Ruscio M., Voet P.E. Jr., Weynants V.E., Philipp M.T.: Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* sl. *J. Infect. Dis.* **182**, 1455–62 (2000)

15. Malloy D.C., Nauman R.K., Paxton H.: Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1089–1093 (1990)
16. Missonne M.-C., Hoet P.P.: Species-specific plasmid sequences for PCR identification of the three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involved in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 269–272 (1998)
17. Nocton J.J., Bloom B.J., Rutledge B.J., Persing D.H., Logigian E.L., Schmid C.H., Steere A.C.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J. Infect. Dis.* **174**, 623–627 (1996)
18. Nocton J.J., Dressler F., Rutledge B.J., Rys P.N., Persing D.H., Steere A.C.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* **330**, 229–234 (1994)
19. Nohlmans M.K.E., Blaauw A.A.M., van den Bogaard A.E.J., van Boven C.P.A.: Evaluation of nine serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 394–400 (1994)
20. Persing D.H., Rutledge B.J., Rys P.N., Podzorski D.S., Mitchell P.D., Reed K.D., Liu B., Fikrig E., Malawista S.E.: Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. *J. Infect. Dis.* **169**, 668–672 (1994)
21. Picken M.M., Picken R.N., Han D., Cheng Y., Strle F.: Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagelin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 1–10 (1996)
22. Pollack R.J., Teleford III S.R., Spielman A.: Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1251–1255 (1993)
23. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A.D., Baranton G.: Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf(5S)-rrl(23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 743–752 (1994)
24. Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Grandstrom M., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J.: A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2097–2102 (2000)
25. Schmidli J., Hunziker T., Moesli P., Schaad U.B.: Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. *J. Infect. Dis.* **158**, 905–906 (1988)
26. Schmidt B.L.: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 185–201 (1997)
27. Schutzer S.E., Coyle P.K., Belman A.L., Golightly M.G., Drulle J.: Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet*, **335**, 312–315 (1990)
28. Schwartz I., Wormser G.P., Schwartz J.J., Cooper D., Weisensee P., Gazumyan A., Zimmermann E., Goldberg N.S., Bittker S., Campbell G.L., Pavia C.S.: Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopses from erythema migrans lesions. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3082–3088 (1992)
29. Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferschedl W., Grandstrom M., Guy E., Gray J.: European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* **108**, 741–747 (1996)
30. Steere A.C. Medical progress. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **321**, 586–596 (1989)
31. Steere A.C., Bartenhagen N.H., Craft J.E., Hutchinson G.J., Newman J.H., Pachner A.R., Rahn D.R., Sigal L.H., Taylor E., Malawista S.E.: Clinical manifestations of Lyme disease. *Zbl. Bakt. Hyg.* **A263**, 201–205 (1986)
32. von Stedingk L.V., Olsson I., Hanson H.S., Asbrink E., Hovmark A.: Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 1–5 (1995)
33. Wallich R., Moter S.E., Simon M.M., Ebnet K., Heiberger A., Kramer M.D.: The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect. Immun.* **58**, 1711–1719 (1990).
34. Wang G., van-Dam A.P., Schwartz I., Dankert J.: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 633–653 (1999)
35. Wilske B.: Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne Zoon. Dis.* **3(4)**, 215–227 (2003)
36. Wilske B., Preac-Mursic V., Fuchs R., Soutschek E. Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*, the etiological agent of Lyme borreliosis. *W. J. Microbiol. Biotech.* **7**, 130–136 (1991)
37. Wilske B., Preac-Mursic V., Gobel U.B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G.: An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 340–350 (1993)
38. Wilske B., Preac-Mursic V., Jauris S., Hofmann A., Pradel I., Soutschek E., Schwab E., Will G., Wanner G.: Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **61**, 2182–2191 (1993)
39. Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Kuhbeck R., Barbour A.G., Kramer M.: Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **539**, 126–143 (1988)

INFORMACJE

Fundacja na Rzecz Polskiej Mikrobiologii

przypomina, że

termin składania wniosków o przyznanie naukowego stypendium wyjazdowego mija z końcem grudnia każdego roku. Regulamin przyznawania stypendium wyjazdowego opublikowany został w *Postęпах Mikrobiologii* w roku 2002 (tom 39, zeszyt 4).

ERRATUM

REKOMENDACJE DOBORU TESTÓW DO OZNACZANIA WRAŻLIWOŚCI BAKTERII NA ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPEUTYKI

Waleria Hryniewicz^{1,2,3}, Agnieszka Sulikowska^{1,2}, Katarzyna Szczypa^{1,2},
Marek Gniadkowski², Anna Skoczyńska²

¹ Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów

² Zespół Mikrobiologii Klinicznej i Profilaktyki Zakażeń, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel.: + 22 8514670, fax/tel.: + 22 841 29 49

³ Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej
00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel +22 8415834, fax/tel. +22 841 29 49

Vol. 42, nr 2, str. 175–192, 2005

Strona 177, punkt 2.1.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa z cefoksytyną lub oksacyliną,

powinno być:

„inkubacja: 24 godz. dla oksacyliny i cefoksytyny w temp 33-35°C, w atmosferze tlenowej, jednakże wynik badania może być wydany po 18 godzinach inkubacji, jeśli szczep jest oporny”.

Strona 178, punkt 2.1.2. Metoda przeglądowa z oksacyliną dla *S aureus*,

powinno być:

„... zanurzyć wykalibrowaną eżę (1 µl) ...”

Strona 178, punkt 2.3.1. Metoda przeglądowa z wankomycyną,

powinno być:

„nanieść punktowo 10 µl ...”

Strona 186, punkt 9. Oznaczanie wrażliwości pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, kolumna 2, werset 4,

powinno być:

„W przypadku pałeczek *Salmonella* spp. nie oznaczać ...”

Spis treści

R. Izdebski – Oporność <i>Streptococcus pneumoniae</i> na penicylinę i inne antybiotyki β -laktamowe	201
B. Bukowska, J. Walory – <i>Anaplasma phagocytophilum</i> – epidemiologia, diagnostyka i terapia	211
A. Mrozik, Z. Piotrowska-Seget, S. Łabużek – Bakterie w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych wybranymi węglowodorami	227
E. Krawczyk, M. Łuczak – Aktywność przeciwwirusowa substancji pochodzenia naturalnego oraz ich pochodnych	239
E. Lonc, S. Andrzejczak – Bioróżnorodność toksyn <i>Bacillus thuringiensis</i> i ich zastosowanie	253
W. Rastawicki, M. Jagielski – Tularemia	265
M. Walczak, W. Donderski – Bacterioneuston zbiorników wodnych	275
Informacje, komunikaty, recenzje	289
S. Tylewska-Wierzbanowska, T. Chmielewski – Diagnostyka serologiczna Boreliozy z Lyme – wytyczne europejskie	289

Contents

R. Izdebski – Resistance to penicillin and other β -lactams in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	201
B. Bukowska, J. Walory – <i>Anaplasma phagocytophilum</i> – epidemiology, diagnostics and therapy	211
A. Mrozik, Z. Piotrowska-Seget, S. Łabużek – Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments	227
E. Krawczyk, M. Łuczak – Antiviral activity of natural compounds and their derivatives	239
E. Lonc, S. Andrzejczak – Biodiversity of toxins of <i>Bacillus thuringiensis</i> and their application	253
W. Rastawicki, M. Jagielski – Tularemia	265
M. Walczak, W. Donderski – Bacterioneuston of water bodies	275
Information, new reports, book reviews	289
S. Tylewska-Wierzbanowska, T. Chmielewski – Serological diagnosis of Lyme borreliosis – European guidelines	289