







MONIKA BIGOS, MAŁGORZATA BRAUNCAJS,  
MAGDALENA KONIECZKA, ANNA MICHALAK-WIKALIŃSKA,  
SYLWIA MOSKWA, DOROTA PASTUSZAK-LEWANDOSKA

## BAKTERIOLOGIA OGÓLNA



MONIKA BIGOS\* , MAŁGORZATA BRAUNCAJS ,  
MAGDALENA KONIECZKA ,  
ANNA MICHALAK-WIKALIŃSKA ,  
SYLWIA MOSKWA ,  
DOROTA PASTUSZAK-LEWANDOSKA 

---

# BAKTERIOLOGIA OGÓLNA

## GENERAL BACTERIOLOGY

Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

\* [monika.bigos@umed.lodz.pl](mailto:monika.bigos@umed.lodz.pl), tel. +48 42 272 57 95

Seria monografii naukowych dotyczących zagadnień z zakresu dyscyplin nauk farmaceutycznych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wydawnictwo recenzowane i punktowane na zasadach zgodnych z Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 lutego 2019 r. w sprawie ewaluacji jakości działalności naukowej (Dz.U. 2019 poz. 392 z późn. zm.).

#### **RADA NAUKOWA**

dr hab. Monika A. Olszewska, prof. uczelni – Redaktor naczelna  
prof. dr hab. Monika Łukomska-Szymańska – Zastępca redaktor naczelnej  
prof. dr hab. Iwona Cygankiewicz  
dr hab. Małgorzata Pikala, prof. uczelni

#### **REDAKTOR PROWADZĄCA**

prof. dr hab. Iwona Cygankiewicz

#### **REDAKCJA**

Magdalena Kokosińska

#### **KOREKTA**

Karolina Wójcikowska

#### **KOREKTA ABSTRAKTÓW ANGIELSKICH**

Katarzyna Kraska

#### **OPRACOWANIE GRAFICZNE**

Tomasz Przybył

#### **BAKTERIOLOGIA OGÓLNA**

Łódź 2023

#### **WYDAWNICTWO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI**

<http://wydawnictwo.umed.pl/>

e-mail: [editorial@reports.umed.pl](mailto:editorial@reports.umed.pl)

#### **Unikatowy identyfikator Wydawnictwa: 60000**

(Komunikat Ministra Edukacji i Nauki z dnia 22 lipca 2021 r. w sprawie wykazu wydawnictw publikujących recenzowane monografie naukowe)

ISBN 978-83-67198-25-7

#### **WYDANIE PIERWSZE**



© 2023. Pewne prawa zastrzeżone na rzecz autorów. Opublikowane na licencji Creative Commons Uznanie Autorstwa (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.pl>).

Licencjobiorca: Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zezwala się na wykorzystanie treści monografii zgodnie z licencją – pod warunkiem zachowania niniejszej informacji licencyjnej oraz wskazania autorów jako właścicieli praw do tekstu.

## **Spis treści**

Rozdział I. Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii .....	11
Rozdział II. Makroskopowa i mikroskopowa charakterystyka bakterii .....	26
Rozdział III. Podstawowe metody diagnostyki mikrobiologicznej.....	38
Rozdział IV. Metody zwalczania drobnoustrojów – dezynfekcja i sterylizacja.....	60
Rozdział V. Metody zwalczania bakterii – leki przeciwbakteryjne .....	74
Rozdział VI. Oporność bakterii na leki przeciwbakteryjne .....	97
Rozdział VII. Mechanizmy patogenezy zakażeń bakteryjnych .....	111

**Streszczenie:** Wiele drobnoustrojów, w sprzyjających warunkach, może przyczynić się do rozwoju choroby w organizmie gospodarza, w tym człowieka. Zależy to od różnych czynników, m.in. czynników wirulencji, jakimi dysponuje mikroorganizm, liczby wnikających do makroorganizmu patogenów oraz kondycji układu odpornościowego gospodarza. Bakterie stanowią jedną z ważnych przyczyn zakażeń wśród ludzi. Szybkie i prawidłowe ustalenie etiologii infekcji pozwala zastosować właściwą terapię przeciwdrobnoustrojową i wspomóc organizm gospodarza w procesie eliminowania zagrożenia jego zdrowia i życia. Znajomość podstawowych zagadnień z dziedziny bakteriologii ogólnej pozwala lepiej rozumieć świat prokariotów, a zatem sprawniej planować proces diagnostyczny i świadomie planować terapię przeciwbakteryjną. Tym właśnie zagadnieniom poświęcono monografię. Omówiono cechy różniące organizmy prokariotyczne i eukariotyczne, podstawy klasyfikacji bakterii oraz główne zasady ich identyfikacji. Opisano warunki niezbędne do uzyskania hodowli bakteryjnej, nieodzownej do dalszych etapów diagnostyki bakteriologicznej. Znajomość podstaw metodyki badawczej, wybór odpowiednich testów diagnostycznych i umiejętna interpretacja wyników zleconych badań pozwalają na szybkie wdrożenie właściwego leczenia, co przyczynia się do znacznej poprawy jakości opieki zdrowotnej i redukcji ponoszonych kosztów, dlatego dużo miejsca poświęcono aktualnie dostępnym i wykorzystywanym w mikrobiologii metodom diagnostycznym, ich możliwościom i ograniczeniom. Ważną część monografii stanowi omówienie sposobów kontroli mikroorganizmów w środowisku szpitalnym (opisano najważniejsze metody dezynfekcji i sterylizacji) oraz w ustroju zakażonego – wymieniono i scharakteryzowano najważniejsze grupy leków przeciwbakteryjnych, przywołano najistotniejsze (na dzień dzisiejszy) mechanizmy oporności bakterii na leki przeciwdrobnoustrojowe, wyjaśniono zasady i znaczenie badania lekowrażliwości bakterii odpowiedzialnych za infekcje wśród ludzi. Ostatnią część opracowania poświęcono podstawowym mechanizmom patogenezы zakażeń bakteryjnych, co stanowi doskonały wstęp do bardziej szczegółowej wiedzy z zakresu bakteriologii medycznej. Monografię kieruje się przede wszystkim do studentów studiów medycznych, dla których może stać się ona źródłem skomasowanej wiedzy, wymaganej do zaliczenia kursu mikrobiologii. Adresatami monografii mogą być również studenci kierunków biologicznych, biotechnologicznych, nauk o zdrowiu, którzy w trakcie studiów przechodzą kurs mikrobiologii. Ponadto wiedza dotycząca leków przeciwbakteryjnych oraz antybiotykooporności bakterii, oznaczania ich lekowrażliwości i zasad interpretacji uzyskanych wyników będzie przydatna dla lekarzy w ich pracy zawodowej.

**Słowa kluczowe:** prokarioty, budowa komórki bakteryjnej, hodowla bakteryjna, metody diagnostyczne stosowane w mikrobiologii, dezynfekcja, sterylizacja, leki przeciwbakteryjne, oporność bakterii na leki przeciwbakteryjne, chorobotwórczość, toksyny bakteryjne, enzymy bakteryjne, patogen oportunistyczny, patogen bezwzględny

**Abstract:** Lots of microorganisms, under favorable conditions, can contribute to the development of the disease in the host, including the human body. It depends on many factors, including virulence factors of the microorganism, the number of pathogens entering the macroorganism and the state of the host's immune system. Bacteria are one of the important causes of human infections. The quick and correct recognition of the etiology of the infection allows the use of appropriate antimicrobial therapy and supports the host's organism in the process of eliminating the pathogen that may pose a threat to the patient's health and life. Knowledge of the basic issues in the field of general bacteriology allows for a better understanding of the world of prokaryotes, and therefore more efficiently planning the diagnostic process and consciously designing antibacterial therapy. These are the issues that the monograph is devoted to. The features differentiating prokaryotic and eukaryotic organisms, the basics of bacterial classification and the basic principles of their identification are discussed. The conditions necessary to obtain a bacterial culture, indispensable for further stages of bacteriological diagnostics, have been described. Knowledge of the basics of research methodology, selection of appropriate diagnostic tests and skilful interpretation of their results are essential. They allow for the rapid implementation of appropriate treatment, contributing to a significant improvement in the quality of health care and reduction of costs. Therefore, much attention has been paid to diagnostic methods currently available and used in microbiology, their opportunities and limitations. An important part of the monograph is a discussion of the methods of controlling microorganisms in the hospital environment - the most important methods of disinfection and sterilization are described, and in the infected organism - the most important groups of antibacterial drugs are listed and characterized, the most important, currently known, mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs are mentioned, the principles and importance of studies on drug susceptibility of bacteria responsible for human infections are explained. The last part of the monograph is devoted to the basic mechanisms of the pathogenesis of bacterial infections, and this is an excellent introduction to more detailed knowledge in the field of medical bacteriology. The monograph is addressed primarily to students of medical studies, for whom it may become a source of consolidated knowledge required for completing a microbiology course. It may also be very useful to students of biological, biotechnological and health sciences who take a microbiology course during their studies. Additionally, knowledge of antibacterial drugs and antibiotic resistance of bacteria, as well as determination of their drug susceptibility and rules for interpreting obtained results will be very valuable for doctors in their professional work.

**Key words:** prokaryotes, bacterial cell structure, bacterial culture, diagnostic methods used in microbiology, disinfection, sterilization, antibacterial drugs, bacterial resistance to antibacterial drugs, pathogenicity, bacterial toxins, bacterial enzymes, opportunistic pathogen, obligatory pathogen

## Lista skrótów

- A** – aglutynacja (ang. *agglutination*)
- AAC** – acetylotransferaza (ang. *acetyltransferase*)
- AIDS** – zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)
- AME** – enzymy modyfikujące antybiotyki aminoglikozydowe (ang. *aminoglycoside-modifying enzymes*)
- AmpC** – cefalosporynaza AmpC (ang. *AmpC cephalosporinase*)
- ANT** – adenylotransferaza (ang. *adenyltransferase*)
- APC** – komórka prezentująca antygen (ang. *antigen-presenting cell*)
- APH** – fosfotransferaza (ang. *phosphotransferase*)
- ATP** – adenozyjno-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)
- BCR** – receptor limfocyty B (ang. *B cell receptor*)
- BEA** – agar z żółcią i eskuliną (ang. *bile esculine agar*)
- BLNAR** – szczep beta-laktamazo-ujemny, ampicylino-oporny (ang. *beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant*)
- BLPACR** – szczep wytwarzający beta-laktamazy, oporny na amoksyliny z kwasem klawulanowym (ang. *beta-lactamase-producing, amoxicillin-clavulanic acid-resistant*)
- BLPAR** – szczep beta-laktamazo-dodatni, ampicylino-oporny (ang. *beta-lactamase-positive, ampicillin-resistant*)
- CA** – antygen wspólny (ang. *common antigen*)
- cAMP** – cykliczny adenozyjno-3',5'-monofosforan (ang. *cyclic adenosine monophosphate*)
- CD** – antygen różnicowania (ang. *cluster of differentiation*)
- CDC** – Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*)
- cDNA** – komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *complementary deoxyribonucleic acid*)
- CHDL** – beta-laktamazy klasy D, hydrolizujące karbapenemy (ang. *carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases*)
- CHIPS** – białko inhibitorowe chemotaksji (ang. *chemotaxis inhibitory protein*)
- CLSI** – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)
- D** – immunodyfuzja (ang. *immunodiffusion*)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- DNazy** – deoksyrybonukleazy (ang. *DNases*)
- dsDNA** – dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *double-stranded DNA*)
- ECHO** – ludzkie jelitowe cytopatogenne wirusy sieroce (ang. *enteric cytopathic human orphan*)
- EDTA** – kwas wersenowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EIA** – metoda immunoenzymatyczna (ang. *enzyme immunoassay*)
- ELISA** – metoda immunoenzymatyczna z grupy testów fazy stałej (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ESBL** – beta-laktamazy o poszerzonym spektrum substratowym (ang. *extended-spectrum beta-lactamases*)
- EUCAST** – Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)
- Fc** – fragment stały przeciwciała (ang. *crystallizable fragment*)
- FC** – cytometria przepływowa (ang. *flow cytometry*)
- FISH** – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*)
- GC** – guanina, cytozyna
- GRAS** – mikroorganizmy uznane za bezpieczne (ang. *generally recognized as safe*)
- H** – hemaglutynacja (ang. *haemagglutination*)
- HA** – odczyn hemadsorpcji (ang. *haemadsorption*)
- HAV** – wirus zapalenia wątroby typu A (ang. *Hepatitis A virus*)
- HEPA** – filtry powietrza o wysokiej skuteczności (ang. *high efficiency particulate airfilters*)

**HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *Human immunodeficiency virus*)  
**HLAR** – oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów (ang. *high-level aminoglycoside resistance*)  
**IB** – immunoblot, immunoblotting  
**IBS** – zespół jelita drażliwego (ang. *irritable bowel syndrome*)  
**IC** – immunochromatografia (ang. *immunochemistry*)  
**ID** – dawka zakaźna (infekcyjna) (ang. *infectious dose*)  
**IF** – immunofluorescencja (ang. *immunofluorescence*)  
**Ig** – immunoglobulina (ang. *immunoglobulin*)  
**IL** – interleukina (ang. *interleukin*)  
**KORLD** – Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów  
**KPC** – karbapenemaza wydzielana przez *Klebsiella pneumoniae* (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)  
**LAB** – bakterie kwasu mlekowego (ang. *lactic acid bacteria*)  
**LOS** – lipooligosacharyd (ang. *lipooligosaccharide*)  
**LP** – lipoproteina (ang. *lipoprotein*)  
**LPS** – lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*)  
**LT** – enterotoksyna ciepłowrażliwa (ang. *heat-labile enterotoxin*)  
**mAb** – przeciwciało monoklonalne (ang. *monoclonal antibody*)  
**MBL** – metalo-beta-laktamaza (ang. *metallo-beta-lactamase*)  
**MCR** – kodowana plazmidowo oporność na kolistynę (ang. *mobilized colistin resistance*)  
**MDR** – wielolekooporność (ang. *multidrug resistance*)  
**MHC** – główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)  
**MIC** – minimalne stężenie hamujące (ang. *minimal inhibitory concentration*)  
**MLS** – makrolidy, linkozamidy, streptograminy B (ang. *macrolides-lincosamides-streptogramin B*)  
**MR** – odczyn z czerwienią metylową (ang. *methyl red*)  
**mRNA** – informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. *messenger ribonucleic acid*)  
**MRSA** – metycylino-oporny *Staphylococcus aureus* (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)  
**MS** – spektrometria masowa (ang. *mass spectrometry*)  
**MSA** – agar z mannitolem i solą (ang. *mannitol salt agar*)  
**MTM** – zmodyfikowane podłoże Thayera–Martina (ang. *modified Thayer-Martin medium*)  
**NAD** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)  
**NAG** – N-acetyloglukozamina (ang. *N-acetylglucosamine*)  
**NAM** – kwas N-acetylmuraminowy (ang. *N-acetylmuramic acid*)  
**NDM** – metalo-beta-laktamaza New Delhi (ang. *New Delhi metallo-beta-lactamase*)  
**NET** – zewnątrzkomórkowa sieć neutrofilowa (ang. *neutrophil extracellular trap*)  
**NIK** – Naczelna Izba Kontroli  
**NT** – odczyn neutralizacji, zobojętniania (ang. *neutralization test*)  
**OWD** – odczyn wiązania dopełniacza  
**OXA-48** – oksacylinaza-48 (ang. *oxacillinase-48*)  
**OZHA** – odczyn zahamowania hemaglutynacji  
**P** – precypitacja (ang. *precipitation*)  
**PABA** – kwas para-aminobenzoowy (ang. *para-aminobenzoic acid*)  
**PAF** – czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet-activating factor*)  
**PAI** – wyspa patogenności (ang. *pathogenicity island*)  
**PAMP** – wzorzec molekularny związany z patogenem (ang. *pathogen-associated molecular pattern*)  
**PBP** – białko wiążące penicyliny (ang. *penicillin-binding protein*)  
**PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)  
**PD** – farmakokinetyka (ang. *pharmacodynamics*)  
**PDR** – pełna oporność (ang. *pandrug resistance*)  
**PK** – farmakokinetyka (ang. *pharmacokinetics*)



**PRP** – *Streptococcus pneumoniae* oporny na penicylinę (ang. *penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae*)

**QAC** – czwartorzędowe związki amoniowe (ang. *quaternary ammonium compounds*)

**QAS** – czwartorzędowe sole amoniowe (ang. *quaternary ammonium salts*)

**QS** – sygnalizator zagęszczenia (ang. *quorum sensing*)

**rDNA** – rybosomalny kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *ribosomal deoxyribonucleic acid*)

**RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism*)

**RIA** – metoda radioimmunologiczna (ang. *radioimmunoassay*)

**RNS** – reaktywna forma azotu (ang. *reactive nitrogen species*)

**ROS** – reaktywna forma tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

**RPR** – makroskopowy test kłaczkujący z nieogrzewaną surowicą (ang. *unheated serum reagin*)

**RT-PCR** – polimerazowa reakcja łańcuchowa połączona z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SARS-CoV-2** – ciężki ostry zespół oddechowy wywołany przez *Coronavirus-2* (ang. *severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2*)

**SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscope*)

**SHV** – beta-laktamaza o zmiennym typie sulfhydrylowym (ang. *sulfhydryl variable-type beta-lactamase*)

**slgA** – wydzielnicza IgA (ang. *secretory IgA*)

**SS** – podłoże dla *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. (*Salmonella*, *Shigella*)

**SSL** – białko gronkowcowe podobne do superantygeny (ang. *staphylococcal superantigen-like protein*)

**ST** – enterotoksyna ciepłostała (ang. *heat-stable enterotoxin*)

**T3SS** – system sekrecyjny typu III (ang. *type III secretion system*)

**TCR** – receptor limfocyty T (ang. *T cell receptor*)

**TEM** – beta-laktamaza Temoniera (ang. *Temoniera beta-lactamase*)

**TEM** – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*)

**TLR** – receptor Toll-podobny (ang. *Toll-like receptor*)

**TNF** – czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*)

**TPHA** – test hemaglutynacji z *Treponema pallidum* (ang. *Treponema pallidum hemagglutination assay*)

**tRNA** – transportowy kwas rybonukleinowy (ang. *transfer ribonucleic acid*)

**TSB** – bulion tryptozowo-sojowy (ang. *tryptic soy broth*)

**UHT** – pasteryzacja za pomocą wysokiej temperatury (ang. *ultra high temperature*)

**UV** – promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultra violet*)

**VDRL** – mikroskopowy test kłaczkujący (ang. *veneral disease research laboratory*)

**VIM** – metalo-beta-laktamaza Verona kodowana na integronie (ang. *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*)

**VISA** – *Staphylococcus aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (ang. *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*)

**VP** – odczyn Vogesa–Proskauera (ang. *Voges-Proskauer test*)

**VRE** – wankomycyno-oporne enterokoki (ang. *vancomycin-resistant enterococci*)

**VRSA** – *Staphylococcus aureus* oporny na wankomycynę (ang. *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*)

**WB** – Western blot, western blotting

**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

**XDR** – ekstensywna wielolekooporność (ang. *extensive resistance*)

## **Wykaz fotografii**

**Strona tytułowa.** Bakterie o kształcie cylindrycznym w preparacie barwionym metodą negatywną.

**Rozdział I.** Komórki bakterii Gram-dodatnich o kształcie kulistym (ziarenkowce) oraz komórki bakterii Gram-ujemnych o kształcie cylindrycznym (pałeczki).

**Rozdział II.** Bakterie beta-hemolizujące.

**Rozdział III.** Test do biochemicznej identyfikacji bakterii.

**Rozdział IV.** Testy do chemicznej kontroli procesu sterylizacji.

**Rozdział V.** Badanie lekowrażliwości bakterii przy użyciu paska z gradientem stężeń leku.

**Rozdział VI.** Wykrywanie karbapenemaz metodą Kirby-Bauera.

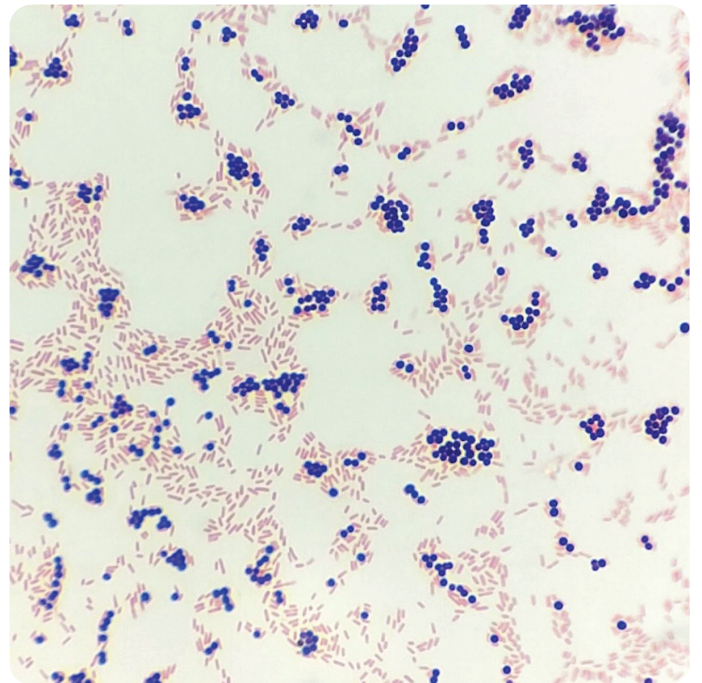
**Rozdział VII.** Test immunochromatograficzny do wykrywania enzymu i toksyn bakteryjnych.

Zdjęcia: kolekcja Zakładu Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Fot. mgr Marlena Malinowska (2021)

# ROZDZIAŁ I. KLASYFIKACJA, BUDOWA I ROZMNAŻANIE BAKTERII

CHAPTER I.  
CLASSIFICATION, STRUCTURE  
AND MULTIPLICATION OF BACTERIA



## Wprowadzenie

Mikroorganizm, termin trudny do precyzyjnego zdefiniowania, najczęściej odnosi się do organizmu, który jest zbyt mały, aby można go było zobaczyć gołym okiem. Skamieniałe szczątki jednokomórkowych organizmów sprzed 3,5–3,8 miliarda lat wskazują, że mikroorganizmy były pionierskimi formami życia na Ziemi i mogą być przodkami wszystkich innych form życia (Eme i in., 2017; Eme i in., 2018).

Ewoluuujące od dawna mikroorganizmy są zdolne do wykorzystywania szerokiego zakresu źródeł energii i rozwijają się w szerokim zakresie siedlisk. Są obecne niemal wszędzie, prawie we wszystkich miejscach na Ziemi – nie tylko w niezwykle zróżnicowanym środowisku naszej planety (m.in. w glebie, wodzie i atmosferze), ale także w organizmach ludzi, zwierząt i roślin, które stają się ich gospodarzami. Organizmy, które mogą rozwijać się w ekstremalnych warunkach środowiska (np. w skrajnie wysokich lub niskich wartościach temperatury otoczenia, jego pH, jak również zasolenia czy ciśnienia), w których większości form życia trudno jest przetrwać, nazywane są ekstremofilami. Do ekstremofilnych bakterii należą m.in. *Thermus aquaticus*, hipertermofilny gatunek bakterii, z którego wyizolowano enzym – ciepłostalą polimerazę taq – wykorzystywany w metodach biologii molekularnej opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) (Chien i in., 1976). Wyodrębniono również *Deinococcus radiodurans*, jeden z organizmów najbardziej opornych na promieniowanie, który jest zdolny do przeżycia nawet po ekspozycji na wysokie dawki promieniowania – do 150 tys. radów (Agostini i in., 1996). Do tej pory nie potwierdzono obecności mikroorganizmów tylko w jednym miejscu na Ziemi, tj. w gorących i nadkwaśnych jeziorach solankowych bogatych w magnez w Dallol, które znajdują się wokół stożka wulkanicznego w depresji Danakil, w Etiopii (Belilla i in., 2019).

Cechą charakterystyczną budowy komórek bakteryjnych jest brak organelli otoczonych błoną, takich jak jądro komórkowe i mitochondrium. Komórki bakteryjne mają zwykle średnicę 0,2–2  $\mu\text{m}$  i długość 0,5–5  $\mu\text{m}$ . Jednak komórki *Thiomargarita namibiensis*, gatunku Gram-ujemnych bakterii o kształcie kokoidalnym, który występuje w osadach oceanicznych szelfu kontynentalnego Namibii, są bardzo duże i widoczne nawet gołym okiem, podczas gdy najmniejsze znane bakterie, należące do rodzaju *Mycoplasma*, mają komórki o średnicy 0,2–0,3  $\mu\text{m}$  (Schulz i Jørgensen, 2001).

Bakterie, pomimo stosunkowo nieskomplikowanej budowy, posiadają dobrze rozwiniętą strukturę komórkową. Są znacznie mniejsze i prostsze w budowie w porównaniu z komórkami eukariotycznymi, stanowią jednak niezwykle złożoną grupę mikroorganizmów, różniących się między sobą wielkością, kształtem, metabolizmem i preferowanym siedliskiem. Takie cechy jak wielkość, kształt i układ przestrzenny komórek bakteryjnych wykorzystywane są do wstępnego potwierdzenia obecności tych mikroorganizmów w badanym materiale.

W rozdziale omówiono cechy różniące organizmy prokariotyczne i eukariotyczne, podstawy klasyfikacji prokariotów oraz zasady ich identyfikacji na podstawie budowy morfologicznej i przemian metabolicznych.

## Różnice między Prokaryota i Eukaryota

Mikroorganizmami są wirusy, bakterie, archeony, grzyby (bez kapeluszowych), niektóre glony i pierwotniaki. W zależności od budowy komórki mikroorganizmy dzielimy na prokarioty i eukarioty (Woese i Fox, 1977). Do prokariotów (określanych także jako prokarioty, organizmy prokariotyczne, łac. *Prokaryota*) zaliczono bakterie i archeony (Fox i in., 1980), a do eukariotów (eukariotów, organizmów eukariotycznych, łac. *Eukaryota*) – grzyby, glony i pierwotniaki. Te dwie grupy organizmów wyraźnie różnią się od siebie (Tabela 1). Eukarioty zbudowane są z komórek posiadających jądro komórkowe z chromosomami odgraniczone od cytoplazmy podwójną błoną białkowo-lipidową. Komórka organizmów prokariotycznych nie zawiera jądra komórkowego oraz innych charakterystycznych dla eukariotów organelli komórkowych.

Wirusy nie mogą być zaliczone ani do *Prokaryota*, ani do *Eukaryota*, gdyż ich wiriony nie wykazują struktury i organizacji komórkowej (Forterre i Prangishvili, 2009). Archeony pod względem budowy przypominają bakterie, ale stanowią odrębną grupę organizmów żywych o odmiennej drodze ewolucyjnej (Eme i in., 2017; Eme i in., 2018).

**Tabela 1.** Różnice pomiędzy *Prokaryota* i *Eukaryota* (Murray i in., 2008).

Cecha	Komórka prokariotyczna	Komórka eukariotyczna
Jądro komórkowe otoczone błoną jądrową	brak	obecne
Kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> , DNA)	obecny, luźno zawieszony w cytoplazmie, w postaci nukleoidu (chromosomu bakteryjnego) i plazmidów	obecny w jądrze komórkowym (tworzy chromosomy) oraz w mitochondriach
Genom	haploidalny	diploidalny
Rozmnażanie	tylko bezpłciowe (przez prosty podział komórki)	płciowe lub bezpłciowe
Wymiana materiału genetycznego przez koniugację, transdukcję i/lub transformację	możliwa	niemożliwa
Błoniaste struktury komórkowe (mitochondria, ciałka Golgiego, retikulum endoplazmatyczne)	brak	obecne
Rybosomy	obecne w cytoplazmie – 70S <sup>1</sup> (zbudowane z podjednostek 50S i 30S)	obecne; 80S (60S, 40S) – rybosomy zlokalizowane na szorstkim retikulum endoplazmatycznym; 70S (50S, 30S) – rybosomy mitochondrialne
Ściana komórkowa	obecna (z wyjątkiem bakterii z rodzajów <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i> ); zawiera peptydoglikan (z wyjątkiem bakterii z rodzaju <i>Chlamydia</i> )	z reguły brak (ale np. u grzybów obecna – zawiera chitynę); peptydoglikan nie występuje
Błona cytoplazmatyczna	obecna (zwykle brak w niej steroli – wyjątek stanowią tu bakterie z rodzajów <i>Mycoplasma</i> i <i>Ureaplasma</i> )	obecna (zawiera sterole)
Wielkość komórki	1–10 μm	10–100 μm

<sup>1</sup> Stała sedymentacji Svedberga (S) – współczynnik określający szybkość poruszania się cząstek koloidalnych pod wpływem sił odśrodkowych w ultrawirówkach

## Klasyfikacja bakterii

Klasyfikacja bakterii opiera się na wynikach analizy makroskopowej i mikroskopowej. Klasyfikacja makroskopowa jest wynikiem oceny charakterystycznych cech wzrostowych kolonii bakteryjnych na różnych pożywkach bakteriologicznych (Tabela 2). Klasyfikacji mikroskopowej dokonuje się na podstawie cech komórek bakteryjnych takich jak wielkość, kształt i ułożenie przestrzenne oraz rezultat barwienia metodą Grama (bakterie Gram-dodatnie lub bakterie Gram-ujemne).

**Tabela 2.** Cechy wzrostowe kolonii bakteryjnej.

Cecha wzrostowa	Opis cechy wzrostowej
Wielkość	kolonie duże, średnie, małe, drobne (średnica kolonii podawana w milimetrach)
Kształt	okrągły, owalny, nieregularny, gwiazdkowaty, promienisty
Brzeg	równy, falisty, zatokowaty, postrzępiony, nitkowaty
Powierzchnia	gładka, szorstka, pomarszczona, nitkowata, ziarnista, matowa, błyszcząca
Stosunek do powierzchni pożywki	kolonia płaska, lekko wzniesiona, wypukła, stożkowata, kraterowata, wrastająca w podłoże
Kolor	barwa kolonii (np. biała, kremowa, beżowa, żółta); zabarwienie podłoża wokół kolonii, obecność strefy przejaśnienia wokół kolonii itp.
Stopień przejrzystości	kolonie przejrzyste, mętne, opalizujące, nieprzejrzyste
Zapach	jaśminowy, kwaśny, gnilny
Zawieszalność (zdolność do tworzenia jednolitej zawiesiny komórek w 0,85% roztworze chlorku sodu, NaCl)	kolonie łatwo lub trudno zawieszalne, (zawiesina grudkowata, niejednorodna itp.)
Konsystencja (sprawdzana za pomocą ezy)	kolonie suche, lepkie, śluzowate

## Podział bakterii ze względu na kształt i ułożenie przestrzenne komórek

Wyróżnia się trzy podstawowe kształty komórek bakteryjnych: kulisty, cylindryczny i spiralny (Cabeen i Jacobs-Wagner, 2005).

Bakterie kuliste (ziarenkowce) mogą być ułożone pojedynczo lub tworzyć układy popodziałowe: dwoinki (łac. *diplococcus*), ziarenkowce czworacze (*Tetracoccus* spp.), pakietowce (*Sarcina* spp.), paciorkowce (*Streptococcus* spp.), gronkowce (*Staphylococcus* spp.).

Bakterie cylindryczne to pałeczki (łac. *bacterium*, np. *Escherichia coli*), laseczki (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Clostridioides difficile*), maczugowce (*Corynebacterium* spp.), prątki (*Mycobacterium* spp.), wrzecionowce (*Fusobacterium* spp.). Niektóre bakterie cylindryczne mogą układać się w pary lub tworzyć łańcuszki czy palisady, np. *Listeria monocytogenes* (Koufakis i in., 2015). Mogą

też formować się w grupy i tworzyć kształt liter V, W, X i Y, jak również palisady, np. *Corynebacterium diphtheriae* (Umeda i Amako, 1983). Warto dodać, że bakteryjne komórki cylindryczne, określane mianem pałeczek, są wyraźnie mniejsze od tych opisywanych jako laseczki.

Bakterie spiralne to np. śrubowce (*Spirillum* spp.) i krętki (*Borrelia* spp., *Borreliella* spp., *Treponema* spp., *Leptospira* spp.).

Niektóre gatunki bakterii wykazują tendencję do różnorodności morfologicznej i wielokształtności komórek (bakterie o kształcie pleomorficznym), np. *Gardnerella vaginalis*.

## Barwienie metodą Grama

Barwienie metodą Grama, opracowane w 1884 roku przez duńskiego lekarza Hansa Christiana Grama, jest nadal podstawowym w mikrobiologii barwieniem różnicującym, dzielącym bakterie na dwie grupy (Moyes i in., 2009): Gram-dodatnie (barwią się na fioletowo) i Gram-ujemne (przybierają barwę różową). Różnice w zabarwieniu komórek bakteryjnych wynikają ze składu i budowy ich ściany komórkowej.

W metodzie tej wykorzystuje się kolejno następujące odczynniki chemiczne: fiolet krystaliczny jako barwnik podstawowy, zaprawę w postaci roztworu jodu w jodku potasu (płyn Lugola), odbarwiacz (alkohol etylowy lub aceton), safraninę jako barwnik kontrastowy.

Barwienie metodą Grama przeprowadza się w następujący sposób:

- Na utrwalony preparat mikroskopowy nalewa się fiolet krystaliczny i pozostawia przez 1 minutę.
- Preparat s płukuje się wodą.
- Na preparat nalewa się płyn Lugola i pozostawia przez 1 minutę.
- Preparat s płukuje się wodą.
- Preparat odbarwia się alkoholem lub acetonem przez 15–30 sekund.
- Preparat s płukuje się wodą.
- Preparat dobarwia się poprzez zalanie go safraniną i pozostawia przez 1 minutę.
- Preparat s płukuje się wodą.
- Preparat osusza się poprzez lekkie odciskanie w bibule.

Przedstawiona procedura barwienia może się w różnych laboratoriach nieznacznie różnić, zależnie od zaleceń producenta zestawów barwników (najczęściej zmiany dotyczą czasów inkubacji), jednak sama zasada metody i zastosowane odczynniki pozostają bez zmian.

Barwnik podstawowy (czyli fiolet krystaliczny) tworzy z jodem kompleksy na tyle duże, że nie mogą one zostać wymyte ze ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, grubszej i bogatszej w peptydoglikan (mureinę). Komórki te, nawet po przepłukaniu alkoholem, pozostają wyraźnie zabarwione na granatowo, a po dodaniu barwnika kontrastowego (czyli safraniny) przybierają barwę fioletową.

Przepłukane alkoholem bakterie Gram-ujemne ulegają natomiast odbarwieniu (stają się przezroczyste, a zatem niewidoczne w preparacie mikroskopowym). Uwidaczniają się dopiero dzięki dobarwieniu preparatu safraniną – przybierają kolor różowy (czyli kolor barwnika kontrastowego).

## Identyfikacja bakterii na podstawie ich aktywności metabolicznej

Klasyfikacja makroskopowa, dokonywana na podstawie analizy charakterystycznych cech wzrostowych kolonii bakteryjnych, zaobserwowanych na różnych pożywkach bakteriologicznych, składa się na identyfikację metaboliczną bakterii w oparciu o ich wymagania gazowe, wymagania wzrostowe lub wykryte produkty metabolizmu bakteryjnego, świadczące o aktywności określonych enzymów bakteryjnych (Váradi i in., 2017).

Oddychanie (utlenianie biologiczne) to złożony, wieloetapowy proces, w którym energia utleniającego substratu zostaje zmagazynowana w wysokoenergetycznych cząsteczkach adenozy-5'-trifosforanu (ang. *adenosine triphosphate*, ATP). Energia wiązań ATP jest wykorzystywana przez organizm do syntezy związków organicznych. Mechanizm tworzenia ATP opiera się na fosforylacji substratowej (glikoliza, cykl pentozowy, fermentacja) lub fosforylacji oksydacyjnej (transport elektronów w łańcuchu oddechowym). Do mechanizmów utleniania biologicznego zaliczamy oddychanie tlenowe, oddychanie beztlenowe i fermentację (Goering i in., 2013).

W oddychaniu tlenowym ostatecznym akceptorem elektronów oderwanych od substratu oddechowego jest tlen cząsteczkowy ( $O_2$ ). Wolne elektrony są przekazywane na przenośniki o wzrastającym potencjale oksydoredukcyjnym (tzw. łańcuch oddechowy). ATP powstaje w wyniku fosforylacji oksydacyjnej.

W oddychaniu beztlenowym ostatecznym biorcą elektronów jest zewnątrzpochozny związek organiczny (fumarany) lub utleniony związek nieorganiczny (azotan, siarczan, węglan). ATP powstaje w wyniku fosforylacji oksydacyjnej. Proces ten jest bardziej wydajny niż fermentacja, ale mniej wydajny w porównaniu z oddychaniem tlenowym.

W trakcie fermentacji część cząsteczki substratu jest utleniana, a część odbierająca elektrony jest redukowana. W procesie tym akceptorem elektronów jest związek organiczny. ATP powstaje w wyniku fosforylacji substratowej.

Ze względu na wymagania dotyczące atmosfery gazowej, w której następuje wzrost bakterii, omawiane mikroorganizmy dzielimy na bezwzględnie tlenowe, mikroaerofilne, względnie beztlenowe, bezwzględnie beztlenowe, aerotolerancyjne i kapnofilne.

W przypadku bakterii bezwzględnie tlenowych  $O_2$  jest niezbędny do ich prawidłowego wzrostu i rozmnażania (komórki bakteryjne giną wobec braku  $O_2$ ). Omawiana grupa bakterii posiada enzymy, które chronią je przed toksycznym działaniem produktów metabolizmu tlenowego (wolnych rodników nadtlenkowych i nadtlenku wodoru,  $H_2O_2$ ), takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza. Dysmutazy ponadtlenkowe przekształcają anionorodniki ponadtlenkowe w  $H_2O_2$  i  $O_2$ . Katalaza przeprowadza reakcję rozkładu  $H_2O_2$  do  $O_2$  i wody. Peroksydazy utleniają różne substraty chemiczne za pomocą  $H_2O_2$ . Do bezwzględnie tlenowych bakterii zaliczane są m.in. *Mycobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Bordetella* spp., *Nocardia* spp.

Bakterie mikroaerofilne także używają  $O_2$  jako końcowego akceptora elektronów, ale wzrastają przy jego zmniejszonym stężeniu (5–10%), np. *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* (Smith i in., 2000).

Bakterie względnie beztlenowe (lub inaczej – względnie tlenowe) rosną w tlenowej bądź beztlenowej atmosferze gazowej. Jeżeli w środowisku ich wzrostu  $O_2$  jest obecny, mogą korzystać z energii pozyskiwanej w wyniku oddychania tlenowego. Przy braku  $O_2$  są w stanie przestawić swój metabolizm na fermentacyjny lub na oddychanie beztlenowe. Do względnie beztlenowych bakterii zalicza się wiele patogennych dla człowieka drobnoustrojów, np. gronkowce, paciorkowce, pałeczki jelitowe.

Bakterie bezwzględnie beztlenowe rosną tylko w warunkach beztlenowych. Mogą pozyskiwać energię w procesie fermentacji (gdzie akceptorem elektronów jest związek organiczny) lub oddychania beztlenowego (gdzie końcowym akceptorem elektronów w łańcuchu oddechowym są związki nieorganiczne, np. azotany, siarczany, węglany). Drobnoustroje te nie posiadają enzymów, które chroniłyby je przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu. Do bezwzględnie beztlenowych bakterii zaliczają się m.in. *Clostridium tetani* i *Clostridioides difficile* (Oren i Rupnik, 2018).

Bakterie aerotolerancyjne przez krótki czas mogą przeżyć (ale nie dzielić się) w obecności tlenu atmosferycznego. Posiadają dysmutazę ponadtlenkową oraz peroksydazę, ale nie dysponują katalazą. Do bakterii aerotolerancyjnych należy np. *Clostridium intestinale* (Elsayed i Zhang, 2005).

Bakterie kapnofilne wymagają do wzrostu wyższego stężenia dwutlenku węgla ( $CO_2$ ), to znaczy 5–10-procentowego. Są to m.in. *Haemophilus influenzae* (Poje i Redfield, 2003) i *Neisseria gonorrhoeae* (Meyer i Buder, 2020).



## WYMAGANIA WZROSTOWE BAKTERII

Jeśli w środowisku bytowania bakterii znajdują się źródła węgla, azotu, energii, woda oraz jony  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  i  $Cl^-$ , to ich minimalne (podstawowe) wymagania wzrostowe są zaspokojone. Pierwiastki konieczne do syntezy białek, tłuszczów i kwasów nukleinowych to węgiel, tlen, wodór, azot, siarka i fosfor. W skład enzymów bakteryjnych wchodzi jony  $Zn^+$ ,  $Mn^+$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $Se^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ . Ze względu na typ metabolizmu bakterie dzielimy na autotrofy i heterotrofy.

Autotrofy redukują nieorganiczne związki węgla do związków organicznych. Autotrofizm to tzw. samożywność – zewnętrzne źródła energii używane są przez organizmy autotroficzne do asymilacji  $CO_2$  (Claassens i in., 2016). Wśród bakterii autotroficznych wyróżnia się:

- fototrofy (fotoautotrofy), które do asymilacji  $CO_2$  wykorzystują energię świetlną w procesie fotosyntezy (np. bakterie zielone, bakterie purpurowe, bakterie siarkowe, sinice),
- chemolitotrofy (chemolitoautotrofy), wykorzystujące do asymilacji  $CO_2$  energię chemiczną, zmagazynowaną w zredukowanych związkach nieorganicznych, uwalnianą podczas ich utleniania w procesie chemosyntezy (np. bakterie nitryfikacyjne, bakterie siarkowe, bakterie żelazowe, bakterie wodorowe).

Heterotrofy przyswajają organiczne (zredukowane) związki węgla. Większość bakterii jest heterotroficzna. Heterotrofizm to tzw. cudzożywność (Schönheit i in., 2016). Wśród bakterii heterotroficznych wyróżnia się:

- prototrofy, które wymagają do wzrostu soli mineralnych oraz tylko jednego związku organicznego (np. glukozy, czy nawet jednowęglowego związku organicznego, np. metanolu, mrówczanu, metanu), np. *Escherichia coli*,
- auktotrofy, wymagające do wzrostu soli mineralnych, związku organicznego stanowiącego źródło węgla i energii oraz tzw. czynników wzrostowych (związków organicznych, których auktotrofy nie potrafią zsyntetyzować), np. w przypadku *Haemophilus influenzae* są to czynnik X (hemina) i czynnik V (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, NAD – ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) (Artman i in., 1983), a w przypadku *Proteus vulgaris* – amid kwasu nikotynowego (witamina B3, niacyna) (Jackson i Copping, 1952).

Ze względu na tolerowany przez bakterie odczyn środowiska (Booth, 1985) drobnoustroje te dzielimy na:

- acidofilne (tolerowany do wzrostu zakres pH 1–6, optymalnie pH 3, np. *Helicobacter pylori*) (De Bernard i in., 1995),
- neutrofilne (tolerowany do wzrostu zakres pH 6–8, optymalnie pH 7, np. *Staphylococcus aureus*),
- alkalofilne (tolerowany do wzrostu zakres pH 8–13, optymalnie pH 10,5, np. *Vibrio cholerae*) (Yoon i Waters, 2019).

Ze względu na optymalną do wzrostu temperaturę środowiska, wśród prokariotów wyróżniono:

- psychrofile ( $T_{min} < 0^\circ C$ ,  $T_{opt} < 15^\circ C$ ,  $T_{max} 20^\circ C$ , np. *Arthrobacter* spp., *Psychrobacter* spp., *Psychromonas* spp.),
- psychrotrofy (psychrotoleranty;  $T_{min} 0^\circ C$ ,  $T_{opt} 15\text{--}30^\circ C$ ,  $T_{max} 25^\circ C$ , np. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*),
- mezofile ( $T_{min} 10\text{--}25^\circ C$ ,  $T_{opt} 20\text{--}40^\circ C$ ,  $T_{max} 40\text{--}45^\circ C$ , np. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; większość bakterii chorobotwórczych dla ludzi to mezofile),
- termofile ( $T_{min} 25\text{--}45^\circ C$ ,  $T_{opt} 45\text{--}60^\circ C$ ,  $T_{max} 70\text{--}80^\circ C$ , np. *Geobacillus* spp., *Alicyclobacillus* spp., *Thermus aquaticus*),
- hipertermofile ( $T_{min} 60^\circ C$ ,  $T_{opt} 80\text{--}100^\circ C$ ,  $T_{max} 110^\circ C$ , np. archeony, *Sulfolobus solfataricus*) (van Wolferen i in., 2013; Moyer i in., 2017).

Jak wspomniano wcześniej, wymagania gazowe i wzrostowe bakterii stanowią część ich charakterystyki makroskopowej. Znajomość tych wymagań pozwala dobrze zaplanować i prawidłowo

przeprowadzić proces hodowli bakterii, uzyskać ich wzrost i kontynuować klasyfikację makroskopową, która – poparta wynikami klasyfikacji mikroskopowej – doprowadzi do końca tok identyfikacji mikroorganizmu (tok diagnostyczny).

Metody identyfikacji bakterii w oparciu o ich charakterystykę mikroskopową i biochemiczną (metabolizm), jak również sposoby identyfikacji antygenowej, opartej na serotypowaniu z użyciem swoistych przeciwciał wiążących się do antygenów na powierzchni komórki bakteryjnej, a także identyfikacja bakterii metodami biologii molekularnej na podstawie charakterystycznych sekwencji DNA lub rybosomalnego RNA, 16S rRNA, omówiono w innych rozdziałach monografii (Rozdział II: Makroskopowa i mikroskopowa charakterystyka bakterii; Rozdział III: Podstawowe metody diagnostyki mikrobiologicznej).

## Budowa komórki bakteryjnej – elementy stałe

W każdej komórce bakteryjnej obecne są takie elementy jak nukleoid, rybosomy, cytoplazma i błona cytoplazmatyczna.

Nukleoid, podstawowy nośnik informacji genetycznej komórki bakterii, występuje zazwyczaj w postaci luźno zawieszonych w cytoplazmie, pojedynczej, kolistej cząsteczki dwuniciowego DNA (ang. *double-stranded DNA*, dsDNA), choć istnieją również bakterie posiadające nukleoid liniowy, np. *Borrelia burgdorferi* (Baril i in., 1989). Nukleoid bywa określany terminem chromosom bakteryjny.

Rybosomy bakteryjne wykazują stałą sedymentacji 70S, składają się z dwóch podjednostek rybosomalnych, 30S i 50S (Shajani i in., 2011). Biorą udział w biosyntezie białek bakteryjnych.

Cytoplazma to wewnętrzna zawartość komórki bakteryjnej, ograniczona błoną cytoplazmatyczną. W 80% zbudowana jest z wody, w której rozpuszczone są białka, głównie enzymatyczne, węglowodany, lipidy, sole mineralne i inne niskocząsteczkowe związki organiczne i nieorganiczne (Abbondanzi i Meyer, 2019).

Błona cytoplazmatyczna – dwuwarstwowa, fosfolipidowa – otacza cytoplazmę i odgradza ją od otaczającego środowiska. Stanowi barierę przepuszczalności komórki bakteryjnej. Styka się bezpośrednio ze ścianą komórkową. Do funkcji błony cytoplazmatycznej u bakterii należą transport elektronów i produkcja energii (a zatem udział w procesie fosforylacji oksydacyjnej), transport substancji pokarmowych do komórki, wydzielanie wyprodukowanych przez komórkę związków oraz tworzenie ściany poprzecznej (łac. *septum*) przy podziale komórkowym (Strahl i Errington, 2017).

Większość bakterii posiada ścianę komórkową. Wyjątek stanowią bakterie z rodzajów *Mycoplasma* i *Ureaplasma*, u których ściany komórkowej brak (Miyata i Ogaki, 2006). W ścianie komórkowej bakterii występuje peptydoglikan (mureina, mukopeptyd); wyjątkiem są tu jednak mikroorganizmy z rodzaju *Chlamydia*, które mają ścianę komórkową, ale nie ma w niej peptydoglikanu.

Cząsteczka peptydoglikanu jest polimerem składającym się z trzech elementów:

- naprzemiennie ułożonych łańcuchów N-acetyloglukozaminy (ang. *N-acetylglucosamine*, NAG) i kwasu N-acetylmuraminowego (ang. *N-acetylmuramic acid*, NAM), połączonych wiązaniami beta-1,4-glikozydowymi, (wrażliwymi na działanie lizozymu),
- łańcucha tetrapeptydowego dołączonego do NAM (L-alanina, kwas D-glutaminowy, kwas diaminopimelinowy lub L-lizyna i D-alanina),
- poprzecznych mostków peptydowych, które łączą tetrapeptydy sąsiednich łańcuchów peptydoglikanu (np. pentaglicyna u *Staphylococcus aureus*) (Monteiro i in., 2019).

Ściany komórek bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych różnią się zarówno budową, jak i składem chemicznym. Grubość ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich wynosi ok. 20 nm (do 50 nm u niektórych mikroorganizmów), a jej struktura jest jednolita. W skład tej ściany komórkowej wchodzi:

- peptydoglikan (stanowi 50–90% masy ściany komórkowej, ok. 40 warstw),
- kwas teichojowy (zbudowany z fosforanu polirybitolu, związany kowalencyjnie z peptydoglikanem),
- kwas lipoteichojowy (zbudowany z fosforanu glicerolu, związany z glikolipidami błony cytoplazmatycznej), polisacharydy (mannoza, ramnoza, glukoza, arabinoza itp.),
- białka (np. białko M u *Streptococcus pyogenes* – Metzgar i Zampolli, 2011; białko A u *Staphylococcus aureus* – Rigi i in., 2019).

Kwasy teichojowe i lipoteichojowe oraz białka adhezyjne biorą udział w adhezji komórek bakteryjnych do różnych powierzchni (ożywionych i nieożywionych).

Komórka bakterii Gram-dodatniej, pozbawiona ściany komórkowej pod wpływem działania lizozymu, nosi nazwę protoplastu i wykazuje aktywność metaboliczną (Martin, 1963). Lizozym to enzym lityczny, hydrolizujący wiązanie beta-1,4-glikozydowe pomiędzy NAG i NAM w peptydoglikanie (Ragland i Criss, 2017). Aktywność lizozymu jest przykładem nieswoistej (wrodzonej) odpowiedzi immunologicznej człowieka. Całkowite zniszczenie ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, a wraz z nią całej komórki bakteryjnej, ma miejsce w roztworach hipotonicznych, z powodu gradientu stężeń.

Grubość ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych wynosi ok. 10–15 nm. Ta ściana komórkowa składa się z dwóch warstw, położonych na zewnątrz od błony cytoplazmatycznej:

- warstwy peptydoglikanu (stanowi ona 5–10% masy ściany komórkowej; zwykle jest to pojedyncza warstwa mureiny, zlokalizowana bezpośrednio nad błoną cytoplazmatyczną, w tzw. przestrzeni periplazmatycznej),
- błony zewnętrznej ściany komórkowej (zbudowanej z podwójnej warstwy fosfolipidów, w której warstwa zewnętrzna została zastąpiona lipopolisacharydem).

Znajdujący się wyłącznie w ścianie komórkowej bakterii Gram-ujemnych lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*, LPS) zbudowany jest z trzech części:

- lipidu A (warunkującego aktywność biologiczną, toksyczną, tej endotoksyny),
- oligosacharydu rdzeniowego (będącego antygenem wspólnym, ang. *common antigen*, CA),
- O-swoistego łańcucha bocznego (będącego antygenem somatycznym O).

U niektórych bakterii Gram-ujemnych (np. *Bordetella* spp., *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp., *Neisseria* spp.), zamiast LPS w ścianie komórkowej występuje lipooligosacharyd (ang. *lipooligosaccharide*, LOS), który składa się z lipidu A i oligosacharydu rdzeniowego, a pozbawiony jest antygeny O (Preston i in., 1996). Zarówno LPS, jak i LOS są endotoksynami.

W błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych znajdują się też białka porynowe i nieporynowe, białka enzymatyczne, np. proteazy, fosfolipazy, białka wiążące penicyliny (ang. *penicillin-binding protein*, PBP).

Przebież periplazmatyczna zlokalizowana jest między błoną cytoplazmatyczną i błoną zewnętrzną ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Zawiera liczne białka enzymatyczne.

W ścianie komórkowej bakterii Gram-ujemnych znajdują się też lipoproteiny (ang. *lipoprotein*, LP), które tworzą mostki między peptydoglikanem a błoną zewnętrzną.

Komórka bakterii Gram-ujemnej, z częściowo zdegradowaną ścianą komórkową, nosi nazwę sferoplastu. Bakterie Gram-ujemne są bardziej odporne na lizozym, ze względu na występowanie u nich zewnętrznej błony ściany komórkowej. W środowisku hipertonicznym (przy wysokim stężeniu sacharozy), w obecności kwasu wersenowego (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) i lizozymu, tworzą się kompleksy z jonami metali, co prowadzi do destabilizacji błony zewnętrznej i powstają sferoplasty (Cross i in., 2019).

Protoplasty i sferoplasty to fenotypowo odmienne warianty komórek bakteryjnych (dawniej nazywane L-formami, a obecnie z języka angielskiego określane jako „cell wall-deficient forms”), których powstawanie uwarunkowane jest odpowiednio brakiem lub zaburzeniem struktury ściany komórkowej. Formy L zaobserwowane i nazwane zostały przez Emmy Klieneberger w 1935 roku ("L" na cześć Instytutu Listera w Londynie, gdzie pracowała) (Klieneberger, 1935). Chociaż formy L bakterii odgrywają rolę w patogenezie chorób zakaźnych u ludzi i zwierząt, ich znaczenie jako czynników etiologicznych pozostaje niejasne (Allan i in., 2009; Errington i in., 2016).

Bakterie z rodzaju *Chlamydia*, podobnie jak większość bakterii Gram-ujemnych, posiadają w ścianie komórkowej LPS, jednak nie występuje tam peptydoglikan (Klöckner i in., 2018). Ściana komórkowa chlamydii składa się jedynie z wewnętrznej i zewnętrznej błony cytoplazmatycznej (podobnych do błon występujących u typowych bakterii Gram-ujemnych). Błona zewnętrzna bogata jest w cysteinowe mostki dwusiarczkowe.

Ściana komórkowa nadaje kształt komórce bakterii, a także chroni ją przed uszkodzeniami mechanicznymi i lizą osmotyczną. Składniki ściany komórkowej mogą indukować odpowiedź immunologiczną gospodarza.

### **Budowa komórki bakteryjnej – elementy dodatkowe**

Tylko u niektórych bakterii występują plazmidy, rzęski, fimbrie, otoczki, warstwa śluzowa i glikokaliks.

Plazmidy to niewielkie (do 100 kbp) pozachromosomowe cząsteczki DNA, zdolne do autonomicznej replikacji, utrzymywania się w cytoplazmie i przenoszenia się pomiędzy komórkami prokariotycznymi (Smillie i in., 2010). Większość plazmidów zawiera region początku replikacji (ori), pozwalający im na niezależne powielanie się w komórkach. Wyróżniono następujące rodzaje plazmidów:

- plazmidy koniugacyjne (oznaczone jako F, umożliwiają one przenoszenie genów między komórkami bakteryjnymi w procesie zwanym koniugacją) (Ippen-Ihler i Minkley, 1986),
- plazmidy warunkujące oporność na antybiotyki (oznaczone jako R) (Carattoli, 2013);
- plazmidy bakteriocynogenne (umożliwiają bakteriom syntezę bakteriocyn) (Daw i Falkiner, 1996),
- plazmidy degradacyjne (kodują białka, pozwalające komórce gospodarza metabolizować nietypowe związki, jak toluen czy kwas salicylowy) (Pemberton, 1983),
- plazmidy wirulencji (kodujące ważne czynniki chorobotwórczości niektórych bakterii, np. enterotoksyny, neurotoksyny) (Pilla i Tang, 2018).

Rzęski (ang. *flagella*) to powierzchniowe twory komórki prokariota zbudowane z flageliny, stanowiące aparat ruchu (chemotaksji) wielu gatunków bakterii (Nakamura i Minamino, 2019). Rzęski zbudowane są z włókna, haczyka i ciałka podstawowego (bazalnego). Włókno składa się z monomerów flageliny, białka cechującego się immunogennością. Flagelina jest tzw. antygenem H. Haczyk łączy włókno z ciałkiem podstawowym, które z kolei zakotwicza rzęskę w ostonach komórkowych bakterii (ścianie komórkowej i błonie cytoplazmatycznej). Ze względu na sposób ułożenia rzęsek na komórce bakteryjnej wyróżnia się następujące typy urzęsienia: monotrichalne (pojedyncza rzęska umieszczona biegunowo, np. *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp.), ditrichalne (lub inaczej amfitrichalne – pojedyncze rzęski na obu biegunach komórki, np. *Alcaligenes faecalis*), lofotrichalne (pęczek rzęsek na jednym lub obu biegunach komórki, np. *Helicobacter* spp.) i peritrichalne (rzęski rozmieszczone naokoło komórki, np. *Escherichia coli*, *Proteus* spp.).

Fimbrie (ang. *pili*) to również powierzchniowe twory komórki prokariotycznej, zbudowane z immunogennego białka piliny (Lukaszczyk i in., 2019). Są cieńsze i krótsze niż rzęski, widoczne tylko w mikroskopie elektronowym. Fimbrie zwykłe (proste), czyli adhezyjne, syntetyzowane są w dużej liczbie (po kilkaset). Uczestniczą w adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni nabłonka wyściełającego drogi oddechowe, przewód pokarmowy, układ moczowy – biorą zatem udział w procesie kolonizacji. Odgrywają niezwykle istotną rolę w patogenezie zakażeń wywoływanych przez bakterie Gram-ujemne, np. większość pałeczek rzędu *Enterobacterales*, drobnoustroje z rodzajów

*Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, bakterie z gatunku *Neisseria gonorrhoeae*. Fimbrie płciowe (ang. *sex pili*), obecne w niewielkiej liczbie (1–3) na powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych, uczestniczą natomiast w transferze materiału genetycznego (plazmidów, fragmentów chromosomalnego DNA bakterii) z komórki dawcy do komórki biorcy w procesie koniugacji (Tomoeda i in., 1976). Fimbrie występują przede wszystkim u bakterii Gram-ujemnych. Coraz więcej wiadomo jednak na temat fimbrii bakterii Gram-dodatnich, np. *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. (Melville i Craig, 2013; Proft i Baker, 2009; Telford i in., 2006). Choć od tamtych różnią się nieco budową, to najprawdopodobniej pełnią podobne funkcje.

Otoczka to bakteryjny polimer zewnątrzkomórkowy, tworzący zbitą warstwę, ściśle otaczającą komórkę i mocno z nią związaną. Bakteryjne szczepy otoczkowe wytwarzają na stałym podłożu hodowlanym kolonie gładkie (typu S, ang. *smooth*), zaś bezotoczkowe – kolonie szorstkie (typu R, ang. *rough*). Otoczki trudno uwidocznic konwencjonalnymi metodami barwienia – można je wykryć dzięki zastosowaniu barwienia negatywno-pozytywnego lub testu puchnięcia otoczek (z wykorzystaniem swoistych przeciwciał). Większość bakterii posiada otoczki polisacharydowe (np. bakterie należące do rzędu *Enterobacterales*, bakterie z gatunku *Streptococcus pneumoniae*, bakterie z rodzajów *Neisseria* spp. czy *Haemophilus* spp.). Niektóre bakterie Gram-dodatnie (np. *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*) posiadają natomiast otoczki peptydowe (Candela i in., 2005). Otoczki bakteryjne indukują odporność humoralną w zakażonym organizmie (produkcja przeciwciał). Ze względu na właściwości serologiczne otoczki wielu gatunków bakterii (np. rzędu *Enterobacterales*) noszą nazwę antygeny K (niem. *Kapselantigene*). Otoczki chronią komórkę bakteryjną przed niekorzystnymi czynnikami środowiska (np. przed wyschnięciem) oraz przed opsonizacją i fagocytozą (tzw. opsonofagocytoza), wpływają na dyfuzję różnych cząsteczek chemicznych, zarówno z komórki, jak i do niej (np. utrudniają penetrację niektórych antybiotyków do komórek bakterii), biorą także udział w patogenezie bakteryjnych chorób zakaźnych (m.in. w początkowym etapie procesu kolonizacji – adhezji). Są jednym z ważniejszych czynników zjadliwości bakterii.

U niektórych bakterii wokół komórki – zamiast otoczki – obecna jest warstwa śluzowa (Angelin i Kavitha, 2020). Jest to bakteryjny polimer zewnątrzkomórkowy, tworzący luźną warstwę, swobodnie przylegającą do powierzchni komórki prokariotycznej, łatwo przez nią tracony, często znajdujący w pożywce hodowlanej, w której wzrastają bakterie.

Istnieją też bakterie, które – zamiast otoczki bakteryjnej lub warstwy śluzowej – dysponują glikokaliksem, będącym siecią bakteryjnych zewnątrzkomórkowych polimerów cukrowych (Ouwerkerk i in., 2013).

Niektóre bakterie mogą tworzyć endospory (spory, przetrwalniki). Są to formy przetrwalne (spoczynkowe), wytwarzane w niekorzystnych warunkach środowiska, jak np. brak wody czy substancji odżywczych (Cutting i Ricca, 2014). Jedna komórka bakteryjna wytwarza tylko jedną endosporę, która u bakterii różnych rodzajów, a nawet gatunków, zajmuje różne położenie w komórce (centralne, biegunowe lub podbiegunowe) i ma średnicę mniejszą lub większą od długości przekroju poprzecznego komórki bakteryjnej, w jakiej jest tworzona – wszystko to jest ważne w procesie mikroskopowej identyfikacji mikroorganizmu. Proces wytwarzania endospor nosi nazwę sporulacji, a ich kiełkowanie w sprzyjających warunkach środowiska nazwano germinacją. Do bakterii sporujących zalicza się Gram-dodatnie laseczki z rodzajów *Bacillus*, *Clostridium* i *Clostridioides*.

Niektóre bakterie biorą aktywny udział w tworzeniu biofilmu, złożonej struktury zbudowanej z wielu komórek bakteryjnych, często różnych rodzajów i gatunków, zawieszonych w warstwie substancji organicznych i nieorganicznych pochodzenia bakteryjnego, wykazującej adhezję zarówno do powierzchni biologicznych, jak i abiotycznych (Tolker-Nielsen, 2015). Do bakterii tworzących biofilm należą m.in. *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*. Sygnalizator zagęszczenia (ang. *quorum sensing*, QS) to mechanizm komunikacji komórka–komórka, który synchronizuje ekspresję genów w odpowiedzi na gęstość komórek populacji (Solano i in., 2014). Rozwój biofilmu i udział sygnalizatora zagęszczenia są ze sobą ściśle powiązane, wpływają na wytwarzanie przez bakterie czynników wirulencji.

Niektóre bakterie są w stanie gromadzić w swojej cytoplazmie materiały zapasowe w postaci np. ziarenek wolnej siarki, skrobi, lipidów, ziarnistości wolutyny (czyli polimeru metafosforanu – u *Corynebacterium diphtheriae*) (Morton i Francisco, 1942).

## Podział komórki bakteryjnej

Bakterie rozmnażają się poprzez prosty podział komórki, w wyniku którego powstaje kolejna komórka bakteryjna (Harry i in., 2006). Jest ona genetycznie identyczna z komórką macierzystą. Podczas podziału komórki prokariotycznej chromosom bakteryjny ulega replikacji. Następnie ściana komórkowa i błona cytoplazmatyczna rosną do wnętrza i tak tworzą ścianę poprzeczną (łac. *septum*), co rozdziela materiał genetyczny i dzieli komórkę bakterii na dwie potomne (Reyes-Lamothe i Sherratt, 2019). Częstotliwość podziałów komórkowych jest różna, zależy od gatunku bakterii oraz od warunków panujących w środowisku, zwykle wynosi średnio 30–60 minut (Bergtrom, 2021). Komórki bakterii z gatunku *Escherichia coli* mogą dzielić się w bardzo krótkim czasie, nawet w ciągu 20 minut (Dewachter i in., 2018). Dla porównania czas generacji różnych gatunków prątków jest zawsze dłuższy niż w przypadku modelowej bakterii *Escherichia coli*. Przykładowo czynnik etiologiczny gruźlicy, *Mycobacterium tuberculosis*, to wolno rosnący prątek, którego czas podziału wynosi 18–24 godziny, z kolei *Mycobacterium leprae*, prątek trądu, podwaja się zaledwie raz na 14 dni i między innymi z tego powodu nie może być hodowany w warunkach *in vitro* (Logsdon i Aldridge, 2018).

## Bibliografia

- Abbondanzieri E.A., Meyer A.S. 2019. More than just a phase: the search for membraneless organelles in the bacterial cytoplasm. *Current Genetics* 65(3), str. 691–694. DOI: [10.1007/s00294-018-00927-x](https://doi.org/10.1007/s00294-018-00927-x).
- Agostini H.J., Carroll J.D., Minton K.W. 1996. Identification and characterization of *uvrA*, a DNA repair gene of *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology* 178(23), str. 6759–6765. DOI: [10.1128/jb.178.23.6759-6765.1996](https://doi.org/10.1128/jb.178.23.6759-6765.1996).
- Allan E.J., Hoischen C., Gumpert J. 2009. Bacterial L-forms. *Advances in Applied Microbiology* 68, str. 1–39. DOI: [10.1016/S0065-2164\(09\)01201-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01201-5).
- Angelin J., Kavitha M. 2020. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules* 162, str. 853–865. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190).
- Artman M., Domenech E., Weiner M. 1983. Growth of *Haemophilus influenzae* in simulated blood cultures supplemented with hemin and NAD. *Journal of Clinical Microbiology* 18(2), str. 376–379. DOI: [10.1128/jcm.18.2.376-379.1983](https://doi.org/10.1128/jcm.18.2.376-379.1983).
- Baril C., Richaud C., Baranton G., Saint Girons I.S. 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Research in Microbiology* 140(8), str. 507–516. DOI: [10.1016/0923-2508\(89\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90083-1).
- Belilla J., Moreira D., Jardillier L., Reboul G., Benzerara K., López-García J.M., Bertolio P., López-Archilla A.I., López-García P. 2019. Hyperdiverse archaea near life limits at the polyextreme geothermal Dallol area. *Nature Ecology and Evolution* 3(11), str. 1552–1561 DOI: [10.1038/s41559-019-1005-0](https://doi.org/10.1038/s41559-019-1005-0).
- Bergtrom G. 2021. Bacterial cell division and the eukaryotic cell cycle. W: Bergtrom G. *Basic Cell and Molecular Biology*. Dostępne online: <https://bio.libretexts.org/@go/page/16535> (dostęp: 24.05.2022).
- Booth I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews* 49(4), str. 359–378. DOI: [10.1128/mr.49.4.359-378.1985](https://doi.org/10.1128/mr.49.4.359-378.1985).
- Cabeen M.T., Jacobs-Wagner C. 2005. Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology* 3(8), str. 601–610. DOI: [10.1038/nrmicro1205](https://doi.org/10.1038/nrmicro1205).
- Candela T., Mock M., Fouet A. 2005. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *Journal of Bacteriology* 187(22), str. 7765–7772. DOI: [10.1128/JB.187.22.7765-7772.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7765-7772.2005).
- Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6–7), str. 298–304. DOI: [10.1016/j.ijmm.2013.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001).
- Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127(3), str. 1550–1557. DOI: [10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976](https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976).
- Claassens N.J., Sousa D.Z., Martins Dos Santos V.A.P., de Vos W.M., van der Oost J. 2016. Harnessing the power of microbial autotrophy. *Nature Reviews Microbiology* 14(11), str. 692–706. DOI: [10.1038/nrmicro.2016.130](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.130).

- Cross T., Ransegnola B., Shin J.H., Weaver A., Fauntleroy K., VanNieuwenhze M.S., Westblade L.F., Dörr T. 2019. Spheroplast-mediated carbapenem tolerance in Gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63(9), nr art. e00756-19. DOI: [10.1128/AAC.00756-19](https://doi.org/10.1128/AAC.00756-19).
- Cutting S.M., Ricca E. 2014. Bacterial spore-formers: friends and foes. *FEMS Microbiology Letters* 358(2), str. 107–109. DOI: [10.1111/1574-6968.12572](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12572).
- Daw M.A., Falkner F.R. 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron* 27(6), str. 467–479. DOI: [10.1016/S0968-4328\(96\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(96)00028-5).
- De Bernard M., Papini E., de Filippis V., Gottardi E., Telford J., Manetti R., Fontana A., Rappuoli R., Montecucco C. 1995. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *Journal of Biological Chemistry* 270(41), str. 23937–23940. DOI: [10.1074/jbc.270.41.23937](https://doi.org/10.1074/jbc.270.41.23937).
- Dewachter L., Verstraeten N., Fauvart M., Michiels J. 2018. An integrative view of cell cycle control in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* 42(2), str. 116–136. DOI: [10.1093/femsre/fuy005](https://doi.org/10.1093/femsre/fuy005).
- Elsayed S., Zhang K. 2005. Bacteremia caused by *Clostridium intestinale*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(4), str. 2018–2020. DOI: [10.1128/JCM.43.4.2018-2020.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.2018-2020.2005).
- Eme L., Spang A., Lombard J., Stairs C.W., Ettema T.J.G. 2017. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology* 15(12), str. 711–723. DOI: [10.1038/nrmicro.2017.133](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.133).
- Eme L., Spang A., Lombard J., Stairs C.W., Ettema T.J.G. 2018. Erratum: Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology* 16(2), nr art. 120. DOI: [10.1038/nrmicro.2017.154](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.154).
- Errington J., Mickiewicz K., Kawai Y., Wu L.J. 2016. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1707), nr art. 20150494. DOI: [10.1098/rstb.2015.0494](https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0494).
- Forterre P., Prangishvili D. 2009. The origin of viruses. *Research in Microbiology* 160(7), str. 466–472. DOI: [10.1016/j.resmic.2009.07.008](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.07.008).
- Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E., Tanner R.S., Magrum L.J., Zablen L.B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B.J., Stahl D.A., Luehrsen K.R., Chen K.N., Woese C.R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209(4455), str. 457–463. DOI: [10.1126/science.6771870](https://doi.org/10.1126/science.6771870).
- Goering R.V., Dockrell H.M., Zuckerman M., Roitt I.M., Chiodini P.L. 2013. *Mims' Medical Microbiology*, wyd. 5. Elsevier, Londyn.
- Harry E., Monahan L., Thompson L. 2006. Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *International Review of Cytology* 253, str. 27–94. DOI: [10.1016/S0074-7696\(06\)53002-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)53002-5).
- Ippen-Ihler K.A., Minkley E.G. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* 20, str. 593–624. DOI: [10.1146/annurev.ge.20.120186.003113](https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.003113).
- Jackson F.L., Copping A.M. 1952. Some aspects of the growth of *Proteus vulgaris* with limiting concentrations of nicotinic acid. *Journal of General Microbiology* 7(1–2), str. 107–116. DOI: [10.1099/00221287-7-1-2-107](https://doi.org/10.1099/00221287-7-1-2-107).
- Klieneberger E. 1935. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *Journal of Pathology and Bacteriology* 40(1). DOI: [10.1002/path.1700400108](https://doi.org/10.1002/path.1700400108).
- Klößner A., Bühl H., Viollier P., Henrichfreise B. 2018. Deconstructing the chlamydial cell wall. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 412, str. 1–33. DOI: [10.1007/82\\_2016\\_34](https://doi.org/10.1007/82_2016_34).
- Koufakis T., Chatzopoulou M., Margaritis A., Tsiakalou M., Gabranis I. 2015. Pneumonia by *Listeria monocytogenes*: a common infection by an uncommon pathogen. *Case Reports in Infectious Diseases* 2015, nr art. 627073. DOI: [10.1155/2015/627073](https://doi.org/10.1155/2015/627073).
- Logsdon M.M., Aldridge B.B. 2018. Stable regulation of cell cycle events in mycobacteria: insights from inherently heterogeneous bacterial populations. *Frontiers in Microbiology* 9, nr art. 514. DOI: [10.3389/fmicb.2018.00514](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00514).
- Lukaszczuk M., Pradhan B., Remaut H. 2019. The biosynthesis and structures of bacterial pili. *Subcellular Biochemistry* 92, str. 369–413. DOI: [10.1007/978-3-030-18768-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_12).
- Martin H.H. 1963. Bacterial protoplasts – a review. *Journal of Theoretical Biology* 5(1), str. 1–34. DOI: [10.1016/0022-5193\(63\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0022-5193(63)90034-1).
- Melville S., Craig L. 2013. Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(3), str. 323–341. DOI: [10.1128/MMBR.00063-12](https://doi.org/10.1128/MMBR.00063-12).
- Metzgar D., Zampolli A. 2011. The M protein of group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence* 2(5), str. 402–412. DOI: [10.4161/viru.2.5.16342](https://doi.org/10.4161/viru.2.5.16342).

- Meyer T., Buder S. 2020. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: current testing and future demands. *Pathogens* 9(2), nr art. 91. DOI: [10.3390/pathogens9020091](https://doi.org/10.3390/pathogens9020091).
- Miyata M., Ogaki H. 2006. Cytoskeleton of Mollicutes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 11(3–5), str. 256–264. DOI: [10.1159/000094059](https://doi.org/10.1159/000094059).
- Monteiro J.M., Covas G., Rausch D., Filipe S.R., Schneider T., Sahl H.G., Pinho M.G. 2019. The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. *Scientific Reports* 9(1), nr art. 5010. DOI: [10.1038/s41598-019-41461-1](https://doi.org/10.1038/s41598-019-41461-1).
- Morton H.E., Francisco A. 1942. The staining of the metachromatic granules in *Corynebacterium diphtheriae*. *Biotechnic and Histochemistry* 17(1), str. 27–29. DOI: [10.3109/10520294209105753](https://doi.org/10.3109/10520294209105753).
- Moyer C.L., Collins E.R., Morita R.Y. 2017. *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier. DOI: [10.1016/b978-0-12-809633-8.02282-2](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.02282-2).
- Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. 2009. Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology* Appendix 3, Appendix 3C. DOI: [10.1002/9780471729259.mca03cs15](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15).
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2016. *Medical Microbiology*, wyd. 6. Elsevier, Filadelfia.
- Nakamura S., Minamino T. 2019. Flagella-driven motility of bacteria. *Biomolecules* 9(7), nr art. 279. DOI: [10.3390/biom9070279](https://doi.org/10.3390/biom9070279).
- Oren A., Rupnik M. 2018. *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: two validly published and correct names. *Anaerobe* 52, str. 125–126. DOI: [10.1016/j.anaerobe.2018.07.005](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.005).
- Ouwerkerk J.P., de Vos W.M., Belzer C. 2013. Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 27(1), str. 25–38. DOI: [10.1016/j.bpg.2013.03.001](https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.001).
- Pemberton J.M. 1983. Degradative plasmids. *International Review of Cytology* 84, str. 155–183. DOI: [10.1016/S0074-7696\(08\)61017-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61017-7).
- Pilla G., Tang C.M. 2018. Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 16(8), str. 484–495. DOI: [10.1038/s41579-018-0031-2](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0031-2).
- Poje G., Redfield R.J. 2003. General methods for culturing *Haemophilus influenzae*. *Methods in Molecular Medicine* 71, str. 51–56. DOI: [10.1385/1-59259-321-6:51](https://doi.org/10.1385/1-59259-321-6:51).
- Preston A., Mandrell R.E., Gibson B.W., Apicella M.A. 1996. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 22(3), str. 139–180. DOI: [10.3109/10408419609106458](https://doi.org/10.3109/10408419609106458).
- Proft T., Baker E.N. 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(4), str. 613–635. DOI: [10.1007/s00018-008-8477-4](https://doi.org/10.1007/s00018-008-8477-4).
- Ragland S.A., Criss A.K. 2017. From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens* 13(9), nr art. e1006512. DOI: [10.1371/journal.ppat.1006512](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512).
- Reyes-Lamothe R., Sherratt D.J. 2019. The bacterial cell cycle, chromosome inheritance and cell growth. *Nature Reviews Microbiology* 17(8), str. 467–478. DOI: [10.1038/s41579-019-0212-7](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0212-7).
- Rigi G., Ghaedmohammadi S., Ahmadian G. 2019. A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): its production and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 66(3), str. 454–464. DOI: [10.1002/bab.1742](https://doi.org/10.1002/bab.1742).
- Schönheit P., Buckel W., Martin W.F. 2016. On the origin of heterotrophy. *Trends in Microbiology* 24(1), str. 12–25. DOI: [10.1016/j.tim.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.003).
- Schulz H.N., Jørgensen B.B. 2001. Big bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, str. 105–137. DOI: [10.1146/annurev.micro.55.1.105](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.105).
- Shajani Z., Sykes M.T., Williamson J.R. 2011. Assembly of bacterial ribosomes. *Annual Review of Biochemistry* 80, str. 501–526. DOI: [10.1146/annurev-biochem-062608-160432](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062608-160432).
- Smillie C., Garcillán-Barcia M.P., Francia M.V., Rocha E.P.C., de la Cruz F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3), str. 434–452. DOI: [10.1128/mmb.00020-10](https://doi.org/10.1128/mmb.00020-10).
- Smith M.A., Finel M., Korolik V., Mendz G.L. 2000. Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Archives of Microbiology* 174(1–2), str. 1–10. DOI: [10.1007/s002030000174](https://doi.org/10.1007/s002030000174).
- Solano C., Echeverz M., Lasa I. 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 18, str. 96–104. DOI: [10.1016/j.mib.2014.02.008](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008).
- Strahl H., Errington J. 2017. Bacterial membranes: structure, domains, and function. *Annual Review of Microbiology* 71, str. 519–538. DOI: [10.1146/annurev-micro-102215-095630](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095630).



- Telford J.L., Barocchi M.A., Margarit I., Rappuoli R., Grandi G. 2006. Pili in Gram-positive pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 4(7), str. 509–519. DOI: [10.1038/nrmicro1443](https://doi.org/10.1038/nrmicro1443).
- Tolker-Nielsen T. 2015. Biofilm development. *Microbiology Spectrum* 3(2), nr art. MB-0001-2014. DOI: [10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014).
- Tomoeda M., Inuzuka M., Date T. 1976. Bacterial sex pili. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 30(1), str. 23–56. DOI: [10.1016/0079-6107\(76\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0079-6107(76)90004-3).
- Umeda A., Amako K. 1983. Growth of the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology and Immunology* 27(8), str. 663–671. DOI: [10.1111/j.1348-0421.1983.tb00629.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1983.tb00629.x).
- van Wolferen M., Ajon M., Driessen A.J.M., Albers S.V. 2013. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. *Extremophiles* 17(4), str. 545–563. DOI: [10.1007/s00792-013-0552-6](https://doi.org/10.1007/s00792-013-0552-6).
- Váradi L., Luo J.L., Hibbs D.E., Perry J.D., Anderson R.J., Orenga S., Groundwater P.W. 2017. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chemical Society Reviews* 46(16), str. 4818–4832. DOI: [10.1039/c6cs00693k](https://doi.org/10.1039/c6cs00693k).
- Woese C.R., Fox G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(11), str. 5088–5090. DOI: [10.1073/pnas.74.11.5088](https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088).
- Yoon S.H., Waters C.M. 2019. *Vibrio cholerae*. *Trends in Microbiology* 27(9), str. 806–807. DOI: [10.1016/j.tim.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.005).

# ROZDZIAŁ II. MAKROSKOPOWA I MIKROSKOPOWA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII

CHAPTER II.  
MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC  
CHARACTERISTICS OF BACTERIA



## Wprowadzenie

Zgodnie z postulatami Roberta Kocha czysta hodowla bakteryjna jest podstawą wszelkich badań nad chorobami bakteryjnymi (Koch, 1932). Izolacja kolonii bakteryjnych umożliwia zaprojektowanie modeli eksperymentalnych do analizy zjadliwości prokariontów i spełnienia kryteriów Kocha, a tym samym ustanawia powiązanie między tymi mikroorganizmami a chorobą zakaźną. Ponadto czysta hodowla bakteryjna pozwala na badanie wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki i jest pierwszym krokiem w procesie ustalania zaleceń dotyczących skutecznego leczenia. Uzyskanie czystej hodowli bakteryjnej jest niezbędne do sekwencjonowania genomu bakterii (Fournier i in., 2007) i badań proteomicznych w celu wyróżnienia określonych białek i analizy ich antygenowości technikami immunoproteomicznymi – ostatecznie ułatwia to produkcję tych białek, które wykorzystuje się następnie jako antygeny podczas projektowania i wytwarzania diagnostycznych testów serologicznych (Fournier i in., 2013). Wreszcie, czysta kultura bakteryjna stwarza możliwość transformacji bakteryjnego materiału genetycznego poprzez dodawanie lub usuwanie genów w celu analizy genetycznych podstaw zjadliwości i lekooporności oraz potencjału inwazyjnego mikroorganizmów.

Hodowla bakterii na podłożach bakteriologicznych jest uznawana za „złoty standard” w diagnostyce bakteriologicznej. Umożliwia m.in. wstępną identyfikację bakterii poprzez określenie ich właściwości biochemicznych, jak również oznaczenie lekowrażliwości izolatów. Stanowi także źródło materiału do badań molekularnych. Aby hodowla spełniała swoje zadanie, podłoża bakteriologiczne należy dobrać odpowiednio do wymagań patogenów obecnych w badanym materiale poprzez zapewnienie im optymalnych warunków wzrostu. Hodowle bakterii obligatoryjnie wewnątrzkomórkowych, którym tradycyjne podłoża bakteriologiczne nie są w stanie zapewnić właściwych warunków rozwoju, są prowadzone w hodowlach komórkowych. Do tej grupy zaliczają się np. bakterie z rodzaju *Chlamydia* (De Puyssseleyr i in., 2017; Meštrović i in., 2019) i *Rickettsia* (Tello-Martin i in., 2018).

W rozdziale omówiono warunki i podłoża bakteriologiczne niezbędne do uzyskania hodowli bakteryjnej oraz podstawy mikroskopowej identyfikacji prokariontów.

## Warunki niezbędne do uzyskania hodowli bakteryjnej

Aby uzyskać wzrost bakterii w postaci hodowli bakteryjnej, należy stworzyć do tego warunki, czyli dostarczyć mikroorganizmom odpowiednich składników wzrostowych, makroelementów i mikroelementów oraz zadbać o optymalne pH, temperaturę, skład atmosfery gazowej i wilgotność środowiska, w którym odbywa się proces hodowli drobnoustrojów. Wymagania gazowe bakterii oraz ich podstawowe wymagania wzrostowe (w tym znaczenie pH i temperatury otoczenia) omówiono w poprzednim rozdziale monografii (Rozdział I: Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii).

## Podłoża bakteriologiczne

Do hodowli bakterii w warunkach laboratoryjnych wykorzystuje się podłoża (pożywki) bakteriologiczne. Drobnoustroje hoduje się w podłożach płynnych (w probówkach lub kolbach Erlenmayera) lub na stałych pożywkach – na płytkach (szalkach) Petriego lub w probówkach (podłoże stałe w probówce może mieć postać skosu bądź słupka).

Hodowanie na pożywkach pozwala na wyodrębnienie prokariontów, ich namnożenie i zbadanie cech morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych i serologicznych. Wiele bakterii wyrasta na sztucznych podłożach, jednak dla niektórych nie opracowano jak dotąd optymalnej pożywki, np. *Treponema pallidum* (Cox, 1994) i *Mycobacterium leprae* (Reibel i in., 2015) – uzyskanie ich wzrostu w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem gospodarza, właściwie nie jest możliwe.

Nie ma uniwersalnej pożywki umożliwiającej wzrost wszystkich bakterii (Lagier i in., 2015). Pewne gatunki nie są zdolne do wzrostu, jeśli nie dostarczymy im gotowych związków chemicznych,

które nazywamy czynnikami wzrostowymi. Należą do nich witaminy, szczególnie z grupy B, zasady purynowe i pirymidynowe, a także niekiedy cholesterol, hem, hemina, NAD i nienasycone kwasy tłuszczowe.

Pożywki stosowane do namnażania drobnoustrojów powinny zawierać niezbędne składniki pokarmowe, mieć odpowiednią wilgotność, pH, ciśnienie osmotyczne, muszą też być jałowe (sterylne).

Ze względu na konsystencję pożywki bakteriologiczne dzieli się na płynne, półpłynne i stałe. Agar to uniwersalny, stosowany powszechnie w mikrobiologii czynnik zestalający pożywki, uzyskiwany z morskich krasnorostów (Lee i in., 2017), który rozpuszcza się w wodzie na gorąco w temp. 100°C, tężeje zaś w temp. 45°C. Podłoża płynne, np. bulion odżywczy, służą głównie do namnażania drobnoustrojów, nie zawierają agaru. Stężenie agaru w podłożach półpłynnych i stałych wynosi odpowiednio: 0,1–0,7% oraz 1,5–2%. Podłoża półpłynne służą do namnażania drobnoustrojów o mniejszym zapotrzebowaniu na tlen, a także do badania ruchu bakterii. Pożywki stałe są wykorzystywane do namnażania i różnicowania drobnoustrojów.

Ze względu na skład chemiczny podłoża bakteriologiczne podzielono na syntetyczne i złożone. Pożywki syntetyczne zawierają ściśle zdefiniowane syntetyczne związki organiczne i nieorganiczne, podczas gdy pożywki złożone (kompleksowe) zawierają dodatkowo surowce pochodzenia naturalnego (ekstrakty mięsne, hydrolizaty kwaśne i enzymatyczne białek itp.), których skład nie jest dokładnie określony.

Ze względu na zastosowanie wśród pożywek bakteriologicznych wyróżnia się następujące podłoża:

- podłoża proste (podstawowe), stosowane do hodowli drobnoustrojów o niewielkich wymaganiach pokarmowych, zaliczamy tu np. bulion odżywczy i agar odżywczy;
- podłoża wzbogacone, jak np. podłoże krwawe czy podłoże czekoladowe, które wykorzystuje się do hodowli drobnoustrojów o znacznych wymaganiach odżywczych; jako substancje wzbogacające stosuje się m.in. krew, surowicę, płyny wysiękowe, wyciąg wątrobowy, mleko, żółtka jaj;
- pożywki wybiórcze, które hamują wzrost bakterii innych niż poszukiwane. Przykładem podłoża wybiórczego jest Thayer-Martin Agar, jak również zmodyfikowana wersja tego podłoża – MTM (ang. *modified Thayer-Martin medium*) (Bonin i in., 1984). Inną pożywką wybiórczą jest selektywne podłoże czekoladowe z dodatkiem czterech antybiotyków (wankomycyny, kolistyny, nystatyny i trimetoprimu), służące do izolacji patogennych gatunków bakterii z rodzaju *Neisseria* (Meyer i Buder, 2020);
- pożywki różnicujące pozwalające na określenie swoistych cech biochemicznych bakterii. Takim podłożem jest np. MacConkey Agar (Macconkey, 1905, 1908), który umożliwia wzrost wielu bakterii Gram-ujemnych i różnicuje je na laktozo-dodatnie i laktozo-ujemne na podstawie ich zdolności do rozkładu laktozy;
- podłoża do hodowli bakterii beztlenowych – są pożywkami wzbogaconymi, w ich skład dodatkowo wchodzi substancje redukujące tlen cząsteczkowy, umożliwia to wzrost drobnoustrojów ściśle beztlenowych; Agar Schaedlera (Schaedler i in., 1965) i podłoże tioglikolanowe są przykładami podłoży do hodowli bakterii beztlenowych (Claros i in., 1995);
- podłoża transportowe – podłoża minimalne (podstawowe), których zadaniem jest utrzymanie żywotności drobnoustrojów w czasie transportu, nie pozwalają one jednak na ich namnożenie. Używane są do przewożenia próbek materiału klinicznego i szczepów drobnoustrojów do laboratorium;
- podłoża transportowo-wzrostowe – stosuje się je do namnażania drobnoustrojów podczas przechowywania, transportu i inkubacji materiału klinicznego (np. podłoża do hodowli bakterii z krwi i płynów jam ciała);
- pożywki do badania lekowrażliwości drobnoustrojów – to podłoża wystandaryzowane, zalecane do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krążkową i metodą z użyciem paska z gradientem stężeń leku (E-test). Są to np. Mueller-Hinton Agar, Mueller-Hinton Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej, Mueller-Hinton Agar z dodatkiem 5% krwi końskiej.

Najważniejsze podłoża bakteriologiczne scharakteryzowano w Tabelach 1, 2 i 3.

**Tabela 1.** Wybrane podłoża stałe na skosach (Szewczyk, 2019; Tille, 2017).

Nazwa	Rodzaj	Zastosowanie	Istotne składniki	Wskaźnik barwny	Efekt
Podłoże Loewensteina–Jensena	wybiórczo-namnażające	do hodowli prątków ( <i>Mycobacterium</i> spp.)	asparagina, glicerol, mąka ziemniaczana, masa jajowa, zieleń malachitowa (hamuje wzrost bakterii innych niż prątki)	brak	wzrost kolonii prątków
Podłoże Loefflera	wzbogacone	do hodowli bakterii o znacznych wymaganiach pokarmowych, np. maczugowców ( <i>Corynebacterium</i> spp.)	bulion wzbogacony, glukoza, surowica końska	brak	maczugowce wyrastają na tej pożywce szybciej niż inne bakterie i wytwarzają duże ilości ziaren wolutyny

**Tabela 2.** Wybrane podłoża płynne (Szewczyk, 2019; Tille, 2017).

Nazwa	Rodzaj	Zastosowanie	Istotne składniki	Wskaźnik barwny	Efekt
Bulion z cukrem	namnażające	do namnażania bakterii	bulion, glukoza	brak	namnażanie bakterii
Bulion tryptozowo-sojowy (ang. <i>tryptic soy broth</i> , TSB)	namnażające	do namnażania bakterii	bulion sojowy, tryptaza	brak	namnażanie bakterii
Podłoże tioglikolanowe z rezazuryną	wzbogacone	zapewnia wzrost bakterii tlenowych, względnie beztlenowych, beztlenowych i mikroaerofilnych	bulion, tioglikolan sodu obniżający potencjał oksydo-redukcyjny pożywki	rezazuryna (wskaźnik redoks, który w formie utlenionej ma barwę różową, a zredukowany odbarwia się)	bakterie tlenowe wyrastają w górnej warstwie pożywki, względnie beztlenowe w całej jej objętości, a beztlenowe i mikroaerofilne – w warstwie dolnej

**Tabela 3.** Wybrane podłoża stałe na płytkach Petriego (Szewczyk, 2019; Tille, 2017).

Nazwa	Rodzaj	Zastosowanie	Istotne składniki	Wskaźnik barwny	Efekt
Podłoże MacConkeya	wybiórczo-różnicujące	służy do izolacji Gram-ujemnych pałeczek rzędu <i>Enterobacterales</i> i Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących (z rodzajów <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Burkholderia</i> )	sole żółciowe i fiolet krystaliczny (hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich); laktoza (pozwala na różnicowanie pałeczek laktozo-dodatnich i laktozo-ujemnych)	czerwień obojętna	wskutek zależnego od rozkładu laktozy zakwaszenia środowiska kolonie bakterii rozkładających laktozę (np. <i>Escherichia coli</i> ) zabarwiają się na kolor różowy, natomiast kolonie pałeczek nie rozkładających laktozy (np. z rodzajów <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> ) są bezbarwne
Podłoże Cocosel (Enterococcosel, agar z żółcią i eskuliną – ang. <i>bile esculine agar</i> , BEA)	wybiórcze	służy do izolacji i identyfikacji enterokoków ( <i>Enterococcus</i> spp.)	sole żółciowe, eskulina, cytrynian żelaza (w wersji rozszerzonej: azydek sodu i kanamycyna, hamujące wzrost bakterii Gram-ujemnych)	brak	podczas wzrostu enterokoków eskulina rozkładana jest do glukozy i eskuletyny, która dyfunduje do pożywki i (wiążąc się w kompleks z cytrynianem żelaza) powoduje jej zaczernienie

**Tabela 3.** Wybrane podłoża stałe na płytkach Petriego (cd.)

Podłoże Chapmana (ang. <i>mannitol salt agar</i> , MSA)	wybiórczo- różnicujące	przeznaczone do izolacji gronkowców ( <i>Staphylococcus</i> spp.)	7,5% NaCl (hamuje wzrost bakterii Gram-ujemnych), mannitol	czerwień fenolowa	różnicowanie gronkowców opiera się na zdolności fermentacji mannitolu – reakcja powoduje zakwaszenie i zmianę barwy podłoża w obecności wskaźnika pH na żółtą (np. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> )
Agar z krwią (podłoże Columbia, „płytką krwawą”)	wzbogacone	przeznaczone dla bakterii o większych wymaganiach pokarmowych	5% krwi baraniej odwłóknionej	brak	pożywka służy ocenie typu hemolizy ( $\alpha$ – przekształcenie hemoglobiny w methemoglobinę, widoczna strefa zazielenienia wokół kolonii; $\beta$ – całkowity rozkład hemoglobiny, widoczne zażółcenie, przejaśnienie wokół kolonii; $\gamma$ – brak hemolizy)



Warunkiem koniecznym do zainicjowania określonej hodowli bakterii jest jałowość podłoża. Oznacza to, że gotowa do użycia pożywka musi być pozbawiona jakichkolwiek mikroorganizmów, bez względu na ich formę (wegetatywną czy przetrwalną). Jałowe podłoże można uzyskać poprzez poddanie go procesowi sterylizacji – zagadnieniu temu poświęcono jeden z kolejnych rozdziałów monografii (Rozdział IV: Metody zwalczania drobnoustrojów – dezynfekcja i sterylizacja).

## **Preparaty mikroskopowe bezpośrednie i pośrednie**

Wyróżniamy dwa główne typy metod badawczych, umożliwiających wykrycie obecności drobnoustrojów i dokonanie ich wstępnej charakterystyki za pomocą mikroskopu: preparaty bezpośrednie (z pobranego materiału klinicznego) oraz preparaty pośrednie (z hodowli w podłożu płynnym lub na podłożu stałym). Zarówno preparaty bezpośrednie, jak i pośrednie mogą – w celach diagnostycznych – zostać wybarwione lub nie.

Metoda badawcza, umożliwiająca ocenę preparatu niewybarwionego, nie jest skomplikowana: polega na wykonaniu preparatu mikroskopowego przez bezpośrednie zawieszenie próbki materiału badanego w wodzie lub soli fizjologicznej (jest to tzw. preparat przyżyciowy, natywny) lub w 10-procentowym roztworze KOH (by – poprzez rozpuszczenie – wyeliminować towarzyszący materiał białkowy). Taki preparat można oglądać w mikroskopie z jasnym lub ciemnym polem widzenia bądź w mikroskopie kontrastowo-fazowym.

Natomiast przed wykonaniem preparatu barwionego rozmaz odpowiednio wykonany na szkiełku mikroskopowym musi być najpierw wysuszony w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalony. Dopiero wtedy preparat jest gotowy do barwienia z zastosowaniem barwników różnicujących.

## **Utrwalanie i barwienie preparatów mikroskopowych**

Utrwalanie preparatów mikroskopowych zawierających mikroorganizmy polega na zabiciu drobnoustrojów i przytwierdzeniu ich do powierzchni szkiełka podstawowego. Celem utrwalania jest ułatwienie barwnikom stosowanym podczas barwienia penetracji ściany komórkowej i wnikięcia do wnętrza komórki prokariotycznej oraz odstonięcie w ścianie komórkowej związków, z którymi barwniki te się zwiążą.

Wyróżniamy dwie metody utrwalania – termiczną i chemiczną. Metoda termiczna polega na trzykrotnym przeciągnięciu szkiełka podstawowego (z wysuszonym wcześniej w temperaturze pokojowej rozmazem mikroorganizmów) w płomieniu palnika. Taki preparat mikroskopowy może już być poddany barwieniu. W metodzie chemicznej na wysuszony w temperaturze pokojowej rozmaz mikroorganizmów nanosi się odpowiedni odczynnik chemiczny (np. formalinę, alkohol lub eter). Po kilku minutach preparat wysycha i również jest gotowy do barwienia.

Barwienie mikroorganizmów polega na wnikięciu zastosowanego barwnika do wnętrza ich komórek i utworzeniu barwnego kompleksu ze ścianą komórkową, komponentami cytoplazmy lub wewnątrzkomórkowymi strukturami komórkowymi. Proces ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych i diagnostycznych komórek drobnoustrojów, np. ich kształtu, wielkości, ułożenia, występowania rzęsek i ich rozmieszczenia, obecności otoczek, a także sposobu rozmnażania oraz tworzenia i rozmieszczenia endospor w komórce.

W barwieniu prostym (monochromatycznym, jednobarwnym) stosuje się jeden barwnik – najczęściej do wizualizacji komórek mikroorganizmów (barwienie pozytywne). Można również zbarwić samo tło preparatu (barwienie negatywne – w tym przypadku niewybarwione komórki mikroorganizmów będą widoczne na wybarwionym tle).

W barwieniu złożonym (polichromatycznym, wielobarwnym) używa się przynajmniej dwóch barwników, w ściśle określonej kolejności.

Reasumując, ze względu na złożoność technik barwienia preparatów mikroskopowych metody barwienia możemy podzielić zależnie od ilości zastosowanych barwników. W metodzie prostej wszystkie komórki mikroorganizmów wybarwiają się na ten sam kolor (stosuje się jeden barwnik), podczas gdy w metodzie złożonej, będącej barwieniem różnicującym, używa się minimum dwóch barwników w celu zabarwienia komórek odmiennych pod względem budowy morfologicznej na różne kolory (np. barwienie Grama) lub wybranych struktur organizmów prokariotycznych – np. endospor w komórkach (barwienie Schaeffer–Fultona) (Moyes i in., 2009a; Schaeffer i Fulton, 1933).

W zależności od celu badania metody barwienia preparatów mikroskopowych podzielono ostatecznie na pozytywne, negatywne i pozytywno-negatywne.

Pozytywne metody barwienia należą do najczęściej wykorzystywanych w bakteriologii. Metoda ta polega na zabarwieniu barwnikiem zasadowym utrwalonego preparatu mikroskopowego, w następstwie czego komórki bakteryjne są zabarwione, a tło preparatu pozostaje niewybarwione. Sięga się tu po następujące zasadowe (anilinowe) barwniki chemiczne: błękit metylenowy, zieleń malachitową, zieleń brylantową, fuksynę zasadową, safraninę, czerwień obojętną, fiolet krystaliczny. Zasadowe barwniki wykazują silne powinowactwo do kwaśnej cytoplazmy mikroorganizmów, tworząc z jej komponentami trwałe, barwne kompleksy.

W barwieniu negatywnym komórki drobnoustrojów pozostają niewybarwione, jednak są widoczne na ciemnym tle, wybarwionym kontrastowo kwaśnym barwnikiem. Metoda polega na zabarwieniu tła nieutrwalonego preparatu z zastosowaniem jednego barwnika – w ten sposób powstaje kontrast pomiędzy wybarwionym tłem i bezbarwną komórką. W barwieniu negatywnym zastosowanie znalazły kwasowe (kationowe) barwniki chemiczne (np. eozyna, fuksyna kwaśna, czerwień Kongo, nigrozyna, Kolargol, tusz chiński) (Moyes i in., 2009b).

Barwienie pozytywno-negatywne najczęściej wykorzystuje się do uwidocznienia otoczek bakteryjnych. W wyniku zastosowania tej techniki otoczki pozostają bezbarwne w kontraście do zabarwionego tła preparatu mikroskopowego i samej komórki bakteryjnej. Barwienie pozytywno-negatywne to połączenie pozytywnej i negatywnej metody barwienia (Beishir, 1996; Leboffe i Burton, 2002).

Do podstawowych metod barwienia wykorzystywanych w bakteriologii należą:

- barwienie metodą Grama,
- barwienie metodą Ziehla–Neelsena,
- barwienie metodą Neissera,
- barwienie metodą Schaeffer–Fultona.

Szczegółowe procedury barwienia preparatów mikroskopowych wymienionymi metodami mogą się nieznacznie różnić w laboratoriach, co wynika z zaleceń różnorodnych producentów zestawów barwników. Różnice najczęściej dotyczą czasów inkubacji preparatu z poszczególnymi odczynnikami chemicznymi. Zasada danej metody i zastosowane w niej barwniki podstawowe nie ulegają zmianie.

## BARWIENIE METODĄ GRAMA

Jest to jedna z najstarszych i najważniejszych technik barwienia w mikrobiologii. Swoją nazwę zawdzięcza duńskiemu bakteriologowi, Hansowi Christianowi Gramowi, który jako pierwszy zastosował ją w 1884 roku, głównie w celu identyfikacji bakterii powodujących zapalenie płuc (Moyes i in., 2009a).

Barwienie obejmuje użycie fioletu krystalicznego jako barwnika podstawowego oraz safraniny (lub fuksyny zasadowej) jako barwnika kontrastowego. Mikroorganizmy, które zachowują kolor podstawowy i wydają się fioletowe pod mikroskopem, określa się terminem bakterii Gram-dodatnich. Natomiast bakterie, które nie przyjmują koloru barwnika podstawowego (tj. fioletowego), a zamiast tego absorbują barwnik kontrastowy i pod mikroskopem wyglądają na różowe, to bakterie Gram-ujemne (Moyes i in., 2009a). Procedurę barwienia preparatów mikroskopowych metodą Grama omówiono w poprzednim rozdziale monografii (Rozdział I: Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii).

## BARWIENIE METODĄ ZIEHL–NEELSENA

Barwienie umożliwia wykrycie tzw. bakterii kwasoopornych, tj. *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., niewrażliwych na działanie kwasów, alkoholi i zasad (Reynolds i in., 2009). W metodzie tej wykorzystywane są następujące odczynniki: barwnik podstawowy – roztwór fuksyny karbolowej, odbarwiacz – zakwaszony alkohol, np. etanol, z dodatkiem 3-procentowego HCl, barwnik kontrastowy – błękit metylenowy (Van Deun i in., 2008).

Barwienie metodą Ziehl–Neelsena przeprowadza się następująco:

- Utrwalony na szkiełku podstawowym preparat mikroskopowy należy zalać roztworem fuksyny karbolowej i podgrzać od dołu szkiełka w płomieniu palnika do momentu pojawienia się pary. Czynność należy powtórzyć jeszcze dwukrotnie.
- Następnie preparat trzeba spłukać wodą i zalać odbarwiaczem, pozostawić do całkowitego odbarwienia na ok. 1 min.
- Po spłukaniu alkoholu wodą preparat trzeba zalać błękitem metylenowym i pozostawić na 2 min.
- Preparat, po spłukaniu ostatniego barwnika i osuszeniu, jest gotowy do oglądania w mikroskopie świetlnym.

Bakterie kwasooporne są zabarwione na czerwono lub różowo, a pozostałe składniki preparatu – na niebiesko.

Obecnie w wielu laboratoriach, wykorzystuje się zmodyfikowane techniki oparte na metodzie Ziehl–Neelsena. Najczęściej stosowaną jest metoda Kinyouna, w której wyeliminowano konieczność podgrzewania utrwalonego preparatu mikroskopowego ze względu na fakt, że w tej modyfikacji jest on eksponowany na zwiększone – w porównaniu z klasyczną metodą Ziehl–Neelsena – stężenie fuksyny karbolowej (Aubert, 1950). Natomiast metoda wykorzystująca fluorochromy, auraminę i rodaminę umożliwia zdecydowanie szybszą analizę wielu pól widzenia w preparacie mikroskopowym (Truant i in., 1962). Wymaga ona jednak zastosowania mikroskopu fluorescencyjnego i – ze względu na koszty odczynników i aparatury – nie jest w diagnostyce powszechnie stosowana. Metoda Ziehl–Neelsena stanowi podstawę diagnostyki zakażeń wywoływanych przez bakterie kwasooporne.

## BARWIENIE METODĄ NEISSERA

Barwienie, dzięki zastosowaniu zakwaszonych barwników, pozwala wykryć obecność wolutynowych (polifosforanowych) ziarnistości zapasowych (Widra, 1959). Ziarnistości te, zwane ciążkami Ernsta–Babeşa, charakteryzują niektóre gatunki maczugowców, czyli bakterii z rodzaju *Corynebacterium*. W metodzie wykorzystywane są następujące odczynniki: barwnik Neissera I (roztwór błękitu metylenowego), barwnik Neissera II (roztwór fioletu krystalicznego), roztwór chryzoidyny.

Barwienie metodą Neissera odbywa się następująco:

- Utrwalony na szkiełku podstawowym preparat mikroskopowy należy zalać świeżo przygotowaną mieszaniną barwników Neissera I i Neissera II w stosunku 2:1 i barwić przez 5 minut.
- Następnie mieszaninę barwników zlewa się z preparatu (bez spłukiwania wodą), by w kolejnym kroku zalać go chryzoidyną na ok. 20 sek.
- Ostatni barwnik zlewa się z preparatu (bez spłukiwania wodą) i osusza przez odcisnięcie na bibule. Tak przygotowany preparat jest gotowy do oglądania w mikroskopie świetlnym.

Ziarnistości wolutynowe wybarwiają się na ciemnofioletowo, a reszta komórki – na żółto.

## BARWIENIE METODĄ SCHAEFFER–FULTONA

Barwienie służy do wykrywania endospor, występujących u bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Clostridium* i *Clostridioides*. W metodzie wykorzystywane są następujące odczynniki: barwnik podstawowy – roztwór zieleni malachitowej, barwnik kontrastowy – safranina (Schaeffer i Fulton, 1933).

Barwienie metodą Schaeffer–Fultona odbywa się następująco:

- Utrwalony na szkiełku podstawowym preparat mikroskopowy należy zalać roztworem zieleni malachitowej i podgrzewać od dołu szkiełka w płomieniu palnika do momentu pojawienia się pary. Czynność należy powtórzyć jeszcze dwukrotnie.
- Następnie preparat trzeba spłukać wodą i zalać safraniną, pozostawić na ok. 40 sekund.
- Preparat, po spłukaniu ostatniego barwnika i osuszeniu, jest gotowy do oglądania w mikroskopie świetlnym.

Spory wybarwiają się na zielono, natomiast komórki wegetatywne bakterii zostają zabarwione na kolor czerwono-różowo.

W praktyce stosowana jest często również modyfikacja metody Schaeffer–Fultona według Wirtza–Conklina (Hamouda i in., 2002), w której wydłużono czas barwienia.

## Bibliografia

- Aubert E. 1950. Cold stain for acid-fast bacteria. *Canadian Journal of Public Health* 41(1), str. 31–32.
- Beishir L. 1996. *Microbiology in Practice*, wyd. 6. Harper Collins College Publishers, New York, NY.
- Bonin P., Tanino T.T., Handsfield H.H. 1984. Isolation of *Neisseria gonorrhoeae* on selective and nonselective media in a sexually transmitted disease clinic. *Journal of Clinical Microbiology* 19(2), str. 218–220. DOI: [10.1128/jcm.19.2.218-220.1984](https://doi.org/10.1128/jcm.19.2.218-220.1984).
- Claros M.C., Citron D.M., Goldstein E.J.C. 1995. Survival of anaerobic bacteria in various thioglycolate and chopped meat broth formulations. *Journal of Clinical Microbiology* 33(9), str. 2505–2507. DOI: [10.1128/jcm.33.9.2505-2507.1995](https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2505-2507.1995).
- Cox DL. 1994. Culture of *Treponema pallidum*. *Methods in Enzymology* 236, str. 390–405. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)36029-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)36029-4).
- De Puysseloyr L., De Puysseloyr K., Vanrompay D., De Vos W.H. 2017. Quantifying the growth of *chlamydia suis* in cell culture using high-content microscopy. *Microscopy Research and Technique* 80(4), str. 350–356. DOI: [10.1002/jemt.22799](https://doi.org/10.1002/jemt.22799).
- Fournier P.E., Drancourt M., Colson P., Rolain J.M., La Scola B., Raoult D. 2013. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nature Reviews Microbiology* 11(8), str. 574–585. DOI: [10.1038/nrmicro3068](https://doi.org/10.1038/nrmicro3068).
- Fournier P.E., Drancourt M., Raoult D. 2007. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. *Lancet Infectious Diseases* 7(11), str. 711–723. DOI: [10.1016/S1473-3099\(07\)70260-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70260-8).
- Hamouda T., Shih A.Y., Baker J.R. Jr. 2002. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in Applied Microbiology* 34(2), str. 86–90. DOI: [10.1046/j.1472-765x.2002.01047.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01047.x).
- Koch R. 1932. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Klinische Wochenschrift* 11(12), str. 428–445. DOI: [10.1007/BF01765224](https://doi.org/10.1007/BF01765224).
- Lagier J.C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. 2015. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 28(1), str. 208–236. DOI: [10.1128/CMR.00110-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14).
- Leboffe M.J., Burton E.P. 2002. *Microbiology Laboratory Theory and Application*, wyd. 1. Morton Publishing Company, Englewood Colorado.
- Lee W.K., Lim Y.Y., Leow A.T.C., Namasivayam P., Abdullah J.O., Ho C.L. 2017. Biosynthesis of agar in red seaweeds: a review. *Carbohydrate Polymers* 164, str. 23–30. DOI: [10.1016/j.carbpol.2017.01.078](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.078).
- Macconkey A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *Journal of Hygiene* 5(3), str. 333–379. DOI: [10.1017/S002217240000259X](https://doi.org/10.1017/S002217240000259X).
- Macconkey A.T. 1908. Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations. *Journal of Hygiene* 8(3), str. 322–334. DOI: [10.1017/S0022172400003375](https://doi.org/10.1017/S0022172400003375).

- Meštrović T., Virok D.P., Ljubin-Sternak S., Raffai T., Burián K., Vraneš J. 2019. Antimicrobial resistance screening in *Chlamydia trachomatis* by optimized McCoy cell culture system and direct qPCR-based monitoring of chlamydial growth. *Methods in Molecular Biology* 2042, str. 33–43.  
DOI: [10.1007/978-1-4939-9694-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9694-0_5).
- Meyer T., Buder S. 2020. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: current testing and future demands. *Pathogens* 9(2), nr art. 91. DOI: [10.3390/pathogens9020091](https://doi.org/10.3390/pathogens9020091).
- Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. 2009a. Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology* Appendix 3, Appendix 3C. DOI: [10.1002/9780471729259.mca03cs15](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15).
- Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. 2009b. Preliminary staining of bacteria: negative stain. *Current Protocols in Microbiology* 15(1), Appendix 3, Appendix 3F. DOI: [10.1002/9780471729259.mca03fs15](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03fs15).
- Reibel F., Cambau E., Aubry A. 2015. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Medicine et Maladies Infectieuses* 45(9), str. 383–393. DOI: [10.1016/j.medmal.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.09.002).
- Reynolds J., Moyes R.B., Breakwell D.P. 2009. Differential staining of bacteria: acid fast stain. *Current Protocols in Microbiology* Appendix 3, Appendix 3H. DOI: [10.1002/9780471729259.mca03hs15](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03hs15).
- Schaedler R.W., Dubos R., Costello R. 1965. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Experimental Medicine* 122(1), str. 59–66. DOI: [10.1084/jem.122.1.59](https://doi.org/10.1084/jem.122.1.59).
- Schaeffer A.B., Fulton M.D. 1933. A simplified method of staining endospores. *Science* 77(1990), nr art. 194. DOI: [10.1126/science.77.1990.194](https://doi.org/10.1126/science.77.1990.194).
- Szewczyk E.M. 2019. *Diagnostyka Bakteriologiczna*, wyd. 3. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa.
- Tello-Martin R., Dzul-Rosado K., Zavala-Castro J., Lugo-Caballero C. 2018. Approaches for the successful isolation and cell culture of American *Rickettsia* species. *Journal of Vector Borne Diseases* 55(4), str. 258–264. DOI: [10.4103/0972-9062.256560](https://doi.org/10.4103/0972-9062.256560).
- Tille P.M. 2017. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, wyd. 14. Elsevier, St. Louis.
- Truant J.P., Brett W.A., Thomas W. Jr. 1962. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hospital Medical Bulletin* 10, str. 287–296.
- Van Deun A., Hossain M.A., Gumusboga M., Rieder H.L. 2008. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 12(1), str. 108–110.
- Widra A. 1959. Metachromatic granules of microorganisms. *Journal of Bacteriology* 78(5), str. 664–670. DOI: [10.1128/jb.78.5.664-670.1959](https://doi.org/10.1128/jb.78.5.664-670.1959).

# ROZDZIAŁ III. PODSTAWOWE METODY DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ

CHAPTER III.  
BASIC METHODS  
OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS



## Wprowadzenie

Wiedza na temat aktualnie dostępnych metod diagnostycznych w mikrobiologii, ich możliwości i ograniczeń, w istotny sposób wspiera lekarza praktyka w jego codziennej pracy. Znajomość tych metod w oczywisty sposób umożliwia ich szersze wykorzystanie (nie stosujemy, jeśli nie znamy) oraz pozwala na poprawne interpretowanie wyników badań.

Celem diagnostyki mikrobiologicznej jest identyfikacja czynnika etiologicznego odpowiedzialnego za zakażenie i określenie jego lekowrażliwości (jeśli to możliwe), a także nadzór mikrobiologiczny i epidemiologiczny. Niezbędne jest do tego zastosowanie odpowiednio dobranych metod diagnostycznych.

Metody diagnostyczne wykorzystywane w mikrobiologii możemy podzielić ze względu na zastosowane techniki (metody klasyczne i metody niehodowlane) lub wykrywane substancje (metody bezpośrednie i metody pośrednie).

Metody klasyczne (konwencjonalne) stanowią złoty standard diagnostyczny i są najczęściej wykorzystywane w bakteriologii (rzadziej w wirusologii). Opierają się na hodowli drobnoustrojów połączonej z izolacją, identyfikacją (barwienia różnicujące, metody biochemiczne, biologiczne) i oceną lekowrażliwości (metody badania lekowrażliwości bakterii omówiono w jednym z kolejnych rozdziałów monografii – Rozdział V: Metody zwalczania bakterii – leki przeciwbakteryjne).

Metody niehodowlane to szereg odczynów immunologicznych (diagnostyka serologiczna) i technik z zastosowaniem biologii molekularnej (Miller i in., 2018).

Metody bezpośrednie służą do wykrycia antygeny lub kwasu nukleinowego patogenu w materiale klinicznym.

Metody pośrednie umożliwiają ocenę odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza na drobnoustroj, np. zarówno poprzez wykrycie przeciwciał odpornościowych i ocenę ich poziomu w surowicy krwi lub badanie aktywności mechanizmów odpowiedzi komórkowej. Interpretacja wyników (często niejednoznacznych) uzyskanych metodami pośrednimi bywa trudna. Do metod pośrednich zalicza się również próby biologiczne na zwierzętach (dziś stosowane bardzo rzadko).

W rozdziale omówiono zasady i zastosowanie mikroskopii oraz identyfikacji biochemicznej, molekularnej i serologicznej w mikrobiologicznym toku diagnostycznym. Przedstawiono szereg dostępnych na dzień dzisiejszy metod diagnostycznych, wykorzystywanych w mikrobiologii. Trzeba pamiętać, że wybór odpowiednich testów powinien być uzależniony od rodzaju materiału klinicznego, rodzaju wykrywanego drobnoustroju, jego spodziewanej ilości w materiale klinicznym, jak również od tego, co wiemy o pacjencie, od którego pobrano materiał (choroby współistniejące, stosowane leki etc.). Należy uwzględnić rekomendacje i wytyczne dotyczące diagnostyki laboratoryjnej oraz możliwości techniczne laboratorium i doświadczenie jednostki badawczej.

W tym miejscu warto przypomnieć jedno z najważniejszych przesłań Europejskiego Dnia Wiedzy o Antybiotykach skierowanych do pracowników służby zdrowia w szpitalach i innych placówkach opieki zdrowotnej: zastosowanie odpowiednich technik diagnostycznych i umiejętna interpretacja wyników badań pozwalają na szybkie wprowadzenie właściwego leczenia, co przyczynia się do znacznej redukcji kosztów i poprawy jakości opieki zdrowotnej (Najważniejsze przesłania ogólne, 2021). Konkluzja ta przewija się w wielu publikacjach dotyczących diagnostyki zakażeń (Caliendo i in., 2013; Dixon i in., 2015; Drobniński i in., 2015; Mizusawa i Carroll, 2020).

Niezależnie od zastosowanych metod diagnostycznych i ich zalet znamienny wpływ na wynik badania ma szereg czynników przedlaboratoryjnych, tj. moment i sposób pobrania próbki, jej transport czy przechowywanie. W wyniku błędów przedlaboratoryjnych może dojść do uzyskania wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych. Aby tego uniknąć, bardzo ważna jest rzetelna edukacja personelu medycznego pobierającego materiał kliniczny.

## Metody mikroskopowe

Drobnoustroje, z uwagi na swoje bardzo małe rozmiary, są niewidoczne gołym okiem, dlatego do ich obserwacji wykorzystuje się metody optyczne, umożliwiające uzyskanie odpowiedniego powiększenia. Rozwój technik mikroskopowych oraz ich zastosowanie przyczyniły się do zrozumienia wielu zjawisk, w których mikroorganizmy odgrywają zasadniczą rolę.

Głównym celem mikroskopowania jest potwierdzenie obecności drobnoustroju w badanym materiale i zaplanowanie dalszych etapów procesu jego identyfikacji. Dzięki metodzie mikroskopowej możliwe jest ustalenie morfologii drobnoustroju (jego wielkości, kształtu, budowy), a także zidentyfikowanie charakterystycznych, swoistych antygenów.

Obecnie w mikrobiologii powszechnie wykorzystuje się sześć głównych technik mikroskopowych. Omówiono je w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Metody mikroskopowe i ich zastosowanie w mikrobiologii (Baj, 2018; Parker i in., 2016).

<b>Metoda mikroskopowa</b>	<b>Zastosowanie metody</b>	<b>Zdolność rozdzielcza mikroskopu</b>
Świetlna (jasnego pola)	<ul style="list-style-type: none"><li>• obserwacja preparatów przyżyciowych (natywnych) niewybarwionych</li><li>• obserwacja preparatów utrwalonych wybarwionych</li><li>• obserwacja żywych lub zabitych komórek bakterii (<math>\geq 10^5</math>/ml materiału)</li><li>• ocena morfologii bakterii (wielkość, kształt, układ)</li></ul>	200 nm
Ciemnego pola	<ul style="list-style-type: none"><li>• obserwacja preparatów przyżyciowych (natywnych) niewybarwionych</li><li>• obserwacja żywych, wyjątkowo cienkich, komórek bakterii</li><li>• obserwacja ruchu bakterii</li></ul>	200 nm
Kontrastowo-fazowa	<ul style="list-style-type: none"><li>• obserwacja żywych niewybarwionych komórek bakterii, obiektów prawie przezroczystych</li><li>• obserwacja trójwymiarowego obrazu wewnątrzkomórkowych struktur bakterii</li></ul>	< 200 nm
Fluorescencyjna	<ul style="list-style-type: none"><li>• obserwacja preparatów utrwalonych wybarwionych</li><li>• obserwacja zabitych komórek bakterii</li><li>• wykrywanie antygenów drobnoustroju lub swoistych wobec nich przeciwciał</li></ul>	100 nm
Konfokalna	<ul style="list-style-type: none"><li>• obserwacja preparatów przyżyciowych lub utrwalonych wybarwionych</li><li>• ocena preparatów przestrzennych, łącznie z budową wewnętrzną</li><li>• rejestracja szybkozmennych procesów w komórkach, tkankach</li></ul>	< 100 nm



**Tabela 1.** Metody mikroskopowe i ich zastosowanie w mikrobiologii (cd.)

Elektronowa:	<ul style="list-style-type: none"><li>• obserwacja preparatów utrwalonych, wybarwionych, grubości <math>\geq 0,1 \mu\text{m}</math></li><li>• obserwacja komórek i cząstek wirusów (<math>&gt; 10^6/\text{ml}</math> badanego płynu)</li></ul>	
skaningowa	<ul style="list-style-type: none"><li>○ ocena trójwymiarowego obrazu powierzchni badanego obiektu</li></ul>	2–20 nm
transmisyjna	<ul style="list-style-type: none"><li>○ obserwacja struktur wewnątrzkomórkowych bakterii</li></ul>	0,05–2 nm

#### MIKROSKOPIA ŚWIETLNA (JASNEGO POLA)

Jest to najczęściej wykorzystywana w bakteriologii metoda mikroskopowania. Mikroskop świetlny wyposażony jest w źródło światła oświetlające preparat na stoliku mikroskopu, kondensator przepuszczający wiązkę światła i skupiający światło na preparacie mikroskopowym, obiektyw wyposażony w soczewkę (soczewka obiektywu) powiększającą obraz preparatu (zależnie od zastosowanego obiektywu: 4–100-krotnie; w bakteriologii wykorzystuje się obiektywy immersyjne – z użyciem immersji olejowej – dające 100-krotne powiększenie) oraz okular wyposażony w soczewkę (soczewka okularu) powiększającą obraz preparatu (zależnie od mikroskopu: 10–15-krotnie) (Baj, 2018; Murray i in., 2016; Parker i in., 2016).

Całkowite powiększenie obrazu w mikroskopie jasnego pola wyraża się iloczynem powiększenia okularu i obiektywu. W celu zwiększenia rozdzielczości mikroskopu przy powiększeniu 1000-krotnym obrazu niezbędne jest zastosowanie olejku immersyjnego, który powinien wypełnić przestrzeń między preparatem a obiektywem, tak aby promienie światła, po przejściu przez szkło z preparatem mikroskopowym, dostały się bezpośrednio do soczewki, nie omijały jej. Umożliwia to współczynnik załamania światła olejku podobny do tego, jaki ma szkło, na którym wykonywane są preparaty mikroskopowe.

Mikroskop świetlny może być wykorzystywany do obserwacji preparatów przyżyciowych, niewybarwionych, jednak w bakteriologii najczęściej stosuje się preparaty utrwalone, wybarwione (np. metodą pozytywną czy negatywną). Podstawowe metody barwienia wykorzystywane w bakteriologii omówiono w dwóch poprzednich rozdziałach monografii (Rozdział I: Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii; Rozdział II: Makroskopowa i mikroskopowa charakterystyka bakterii). W mikroskopie jasnego pola nie jest możliwa bezpośrednia obserwacja cząstek wirusowych.

#### MIKROSKOPIA CIEMNEGO POLA

W tej technice mikroskopowania na ciemnym tle obserwujemy jasne, oświetlone bocznie obiekty. Dzieje się tak dzięki zastosowaniu specjalnej konstrukcji kondensora, który formuje wiązkę światła prawie równoległą do powierzchni preparatu, co zapobiega przechodzeniu centralnych promieni światła do soczewki obiektywu przez preparat. Skutkuje to uzyskaniem większej zdolności rozdzielczej mikroskopu i możliwością obserwacji mniejszych komórek bakteryjnych, jak również bardzo cienkich komórek prokariotycznych (np. krętków) i ich ruchu (Baj, 2018; Murray i in., 2016; Parker i in., 2016). Mikroskopia ciemnego pola nie ma zastosowania w badaniach nad budową cząstek wirusowych.

#### MIKROSKOPIA KONTRASTOWO-FAZOWA (ODBICIOWA Z KONTRASTEM FAZOWYM)

Mikroskopia z kontrastem fazowym, dzięki zastosowaniu bardziej złożonych układów optycznych (kolektor, przysłona aperturowa, dodatkowa soczewka, zwierciadło płaskie półprzezroczyste, płytka fazowa, przesłona pierścieniowa), wykorzystuje różnice w przechodzeniu światła przez obiekty przezroczyste o różnym współczynniku załamania światła (charakteryzującym struktury o różnej gęstości) bądź grubości (Baj, 2018; Murray i in., 2016; Parker i in., 2016).

W wyniku nakładania się i interferencji dwóch rodzajów światła (bezpośredniego i dyfrakcyjnego) w płaszczyźnie obrazowej obiektywu powstaje obraz fazowo-kontrastowy preparatu.

Struktury silniej załamujące światło widziane są jako ciemniejsze od pozostałych. Tworzy się trójwymiarowy obraz komórki, umożliwiający szczegółową analizę budowy wewnętrznej drobnoustroju. W mikroskopie kontrastowo-fazowym nie jest możliwa obserwacja cząstek wirusowych.

#### MIKROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

W tej technice mikroskopowej wykorzystuje się fluorescencję naturalną (autofluorescencję) bądź fluorescencję wzbudzoną po wyznakowaniu specyficznymi znacznikami fluorescencyjnymi (fluorochromami, fluoroforami) (Baj, 2018; Murray i in., 2016; Parker i in., 2016).

Mikroskop fluorescencyjny to mikroskop odbiciowy, wyposażony w intensywne źródło światła (np. wysokociśnieniową lampę rtęciową, halogenową, ksenonową), filtry wzbudzające, zwierciadło dichroiczne oraz soczewki.

Zadaniem zwierciadła jest skierować światło wzbudzające przez obiektyw na badany preparat mikroskopowy i jednocześnie w jak największym stopniu przepuszczać światło fluorescencyjne do okularu. W odpowiednio skonfigurowanym mikroskopie fluorescencyjnym do obserwatora powinno dotrzeć jedynie światło pochodzące z fluorescencji, obrazujące wybarwione struktury na ciemnym tle. To znacznie zwiększa czułość metody i poprawia kontrast obserwowanych szczegółów.

Zastosowanie barwników fluorescencyjnych sprzężonych z przeciwciałami monoklonalnymi umożliwiło wysoce swoistą identyfikację oraz obrazowanie komórek i struktur subkomórkowych, często bardzo trudnych lub wręcz niemożliwych do zobrazowania za pomocą klasycznego mikroskopu świetlnego. Mikroskopia fluorescencyjna pomaga wykryć pojedyncze komórki bakterii (np. prątki), cząsteczki (np. ciała wtrętowe) lub organelle komórkowe. Wykorzystuje się także antygeny związane z fluorochromami w celu wykrycia swoistych do nich przeciwciał, np. w surowicy pacjenta. W rutynowej diagnostyce używa się tylko jednego znacznika fluorescencyjnego do wybarwienia jednego preparatu mikroskopowego.

#### MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Źródłem światła w mikroskopie konfokalnym jest laser, ogniskujący wiązkę światła na pojedynczym punkcie obserwowanego obiektu (Baj, 2018; Murray i in., 2016; Parker i in., 2016). Założeniem mikroskopii konfokalnej, w odróżnieniu od optycznej, jest wyeliminowanie obrazów pochodzących spoza płaszczyzny ogniskowania. W każdym obrazie widoczne są tylko elementy na poziomie danej warstwy. Obiekty umiejscowione poniżej i powyżej są niewidoczne. Uzyskany obraz charakteryzuje się słabym tłem i ostrymi konturami (lepszy kontrast), co pozwala na zastosowanie wyższej rozdzielczości (powiększeń). Dodatkowo po zebraniu szeregu przekrojów badanego obiektu z różnych głębokości można otrzymać obraz warstwowy. Dzięki temu tworzony jest trójwymiarowy obraz analizowanego preparatu wraz z jego budową wewnętrzną, np. tkanki, bez konieczności jej krojenia, czy biofilmu – bez zniszczenia jego struktury przestrzennej.

Warunkiem uzyskania obrazu w mikroskopie konfokalnym jest zastosowanie jednocześnie kilku barwników fluorescencyjnych. Podczas późniejszej analizy poszczególne obrazy mogą być na siebie nakładane (Paszkowski i in., 2016).

#### MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

Rozwiązaniem, które w mikroskopie elektronowym umożliwiło uzyskanie znacznie lepszej rozdzielczości od tej stosowanej w mikroskopie świetlnym czy z kontrastem fazowym, jest promieniowanie o długości fali krótszej niż długość światła widzialnego (Baj, 2018; Murray i in., 2016; Parker i in., 2016). Taki efekt otrzymuje się przy wykorzystaniu wiązki elektronowej (zamiast wiązki światła) jako promieniowania służącego specyficznemu „oświetlaniu” próbki. Do skupienia wiązki elektronowej, zamiast soczewek szklanych, stosuje się cewki elektromagnetyczne. W wyniku kontaktu próbki z wiązką elektronową powstają sygnały w postaci elektronów i fotonów w bardzo dużym zakresie fal – od podczerwieni aż do promieniowania rentgenowskiego. Sygnały pochodzące z próbki są zbierane przez układ detektorów i wykorzystywane do obrazowania próbki. Mikroskopia elektronowa pozwala na charakterystykę składu, właściwości i struktury badanej materii.

W skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *scanning electron microscopy*, SEM) preparat pokrywa się bardzo cienką warstwą metalu ciężkiego (np. złotem lub platyną). Wiązka elektronowa skanuje, linia po linii, wybrany obszar próbki. Detektor rejestruje sygnały emitowane przez próbkę – mierzy liczbę elektronów rozproszonych lub odbitych – i traktuje to jako kontrolę intensywności kolejnych punktów na obrazie powstającym na ekranie kontrolnym. Mikroskop tworzy wyraziste, trójwymiarowe, przestrzenne obrazy powierzchni próbki, o dużej głębi ostrości i rozdzielczości (Kim, 2016).

W transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *transmission electron microscopy*, TEM) przygotowanie próbki jest trudne i wymaga zastosowania skomplikowanych procedur. Preparat musi być niezwykle cienki. Próbkę umieszcza się w próżni. Rejestrowane są sygnały pochodzące od elektronów przechodzących przez badaną próbkę. Kontrast uzyskuje się zazwyczaj przez nałożenie barwników, które zawierają metale ciężkie, gęste elektronowo. Dzięki różnicom w powinowactwie elementów struktury komórki do jonów metali ciężkich uzyskuje się obraz umożliwiający szczegółową analizę budowy wewnętrznej drobnoustroju lub wykrycie cząstek wirusowych. Obraz jest jednak płaski, dwuwymiarowy (Boudjemaa i in., 2019).

Odmianą mikroskopii elektronowej jest mikroskopia immunoelektronowa, wykorzystywana do zlokalizowania antygeny w odpowiednim regionie komórek, które traktuje się przeciwciałami monoklonalnymi, kowalencyjnie połączonymi z metalami ciężkimi. Metal rozprasza elektrony, a obecność związanych przeciwciał jest uwidaczniana w postaci gęstej plamy na fotografii.

## **Diagnostyka biochemiczna**

Jednym z podstawowych elementów klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej jest określenie właściwości biochemicznych drobnoustroju. Bada się wykorzystywane przez bakterie źródła węgla i azotu, oznacza aktywność enzymatyczną mikroorganizmów poprzez wykrywanie końcowych produktów metabolizmu określonych substratów.

Właściwości biochemiczne, wykorzystywane w procesie identyfikacji bakterii, zostały przedstawione w Tabeli 2. Ocena innych właściwości biologicznych drobnoustrojów, tj. obecność toksyn czy swoistych antygenów, odpowiednio dobranych dla określonych grup bakterii, może w znaczny sposób ułatwić identyfikację patogenów (Tabela 3).

**Tabela 2.** Właściwości biochemiczne wykorzystywane do identyfikacji bakterii (Szewczyk, 2019).

<b>Właściwości</b>	<b>Próba</b>	<b>Oceniane właściwości biochemiczne przez wykrywanie</b>
sacharolityczne	szereg cukrowy	zdolność rozkładu różnych cukrów w podłożu płynnym
	z czerwienią metylową MR (ang. <i>methyl red</i> )	zdolność fermentacji glukozy w podłożu płynnym
	Voges–Proskauera (VP)	zdolność fermentacji glukozy w podłożu płynnym
	na podłożu Hugh–Leifsona	drogi rozkładu cukrów w podłożu płynnym (tlenowa lub beztlenowa)
	na podłożu MacConkeya	zdolność rozkładu laktozy na podłożu stałym
	na podłożu Kliglera	zdolność rozkładu glukozy i laktozy na podłożu stałym
	na podłożu SS ( <i>Salmonella, Shigella</i> )	zdolność rozkładu laktozy na podłożu stałym
	na podłożu Levine’a	zdolność rozkładu sacharozy i laktozy na podłożu stałym
	na podłożu Chapmana	zdolność rozkładu mannitolu na podłożu stałym
związane z metabolizmem azotowym	upłynnianie żelatyny	zdolność rozkładu żelatyny
	na podłożu Christensena	zdolność rozkładu mocznika do amoniaku przez ureazę w podłożu płynnym
	na podłożu Kliglera	zdolność rozkładu aminokwasów z wytworzeniem siarkowodoru na podłożu stałym
	na podłożu SS	zdolność rozkładu aminokwasów z wytworzeniem siarkowodoru na podłożu stałym
	z odczynnikiem Ehrlicha	zdolność rozkładu tryptofanu do indolu w podłożu płynnym
	z odczynnikiem Nesslera	zdolność rozkładu aminokwasów w warunkach tlenowych (deaminacja) z wytworzeniem amoniaku w podłożu płynnym
	na podłożu Falkowa	zdolność rozkładu aminokwasów w warunkach beztlenowych (dekarboksylacja) w podłożu płynnym
lipolityczne	na podłożu z Tween 80	zdolność wytwarzania lipaz na podłożu stałym
utleniająco- redukujące	z odczynnikiem Griessa	zdolność redukcji azotanów do azotynów w podłożu płynnym

**Tabela 3.** Oceniane właściwości biologiczne wykorzystywane w identyfikacji bakterii (Szewczyk, 2019).

Identyfikowane elementy	Przykłady	Metody diagnostyczne
Enzymy	katalaza koagulaza oksydaza fosfataza	<ul style="list-style-type: none"> <li>• szybkie testy: szkiełkowe, lateksowe, paskowe</li> <li>• posiew na podłoże płynne lub stałe</li> </ul>
Toksyny	hemolizyny (cytolizyny) LPS enterotoksyny ciepłowrażliwe (ang. <i>heat-labile enterotoxin</i> , LT) enterotoksyny ciepłostale (ang. <i>heat-stable enterotoxin</i> , ST)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• barwienie preparatu mikroskopowego</li> <li>• hodowla na podłożach diagnostycznych</li> <li>• biologia molekularna</li> </ul>
Swoiste antygeny powierzchniowe	O157 <i>Escherichia coli</i> A, B, C, Y, W135 <i>Neisseria meningitidis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• badania serologiczne (testy lateksowe)</li> </ul>

Należy jednak pamiętać, że podstawowym warunkiem oceny właściwości biochemicznych bakterii jest uprzednie uzyskanie czystej hodowli drobnoustroju. Wstępna identyfikacja bakterii wyrastających na podłożach stałych polega na makroskopowej ocenie kolonii bakteryjnych (ich wielkości, kształtu, koloru). Na tym etapie możliwa jest ocena pewnych dodatkowych, ale znacznie ułatwiających identyfikację, właściwości biochemicznych mikroorganizmów, np. zdolności do hemolizy na podłożu z krwią. Podstawy makroskopowej i mikroskopowej klasyfikacji bakterii omówiono w poprzednich rozdziałach monografii (Rozdział I: Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii; Rozdział II: Makroskopowa i mikroskopowa charakterystyka bakterii).

Dobór kolejnych testów do identyfikacji dokonywany jest po mikroskopowej ocenie morfologii komórek bakteryjnych w preparacie barwionym metodą Grama (lub inną) i przeprowadzeniu prostych testów biochemicznych (np. oceniających zdolność syntezy określonych enzymów, jak katalaza, oksydaza etc.).

W laboratoriach zajmujących się rutynową diagnostyką mikrobiologiczną próby wymienione w Tabeli 2 w znacznym stopniu zostały włączone w gotowe, wystandaryzowane zestawy zminiaturyzowanych testów z wieloma zliofilizowanymi odczynnikami w jednym panelu lub na pasku. Takie zestawy, przeznaczone dla określonej grupy bakterii, umożliwiają odczyt nawet 20 cech biochemicznych jednocześnie, co ułatwia i skraca proces identyfikacji bakterii. Przykładem są systemy API (ang. *analytical profile index*) do odczytu manualnego uzyskanych wyników (np. API 20 E dla bakterii z rzędu *Enterobacterales* lub API 20 Staph dla gronkowców) oraz panele do odczytów automatycznych za pomocą wyspecjalizowanych, przeznaczonych do tego urządzeń, np. Phoenix BD, Vitek BioMérieux (Saffert i in., 2011; Arastehfar i in., 2019).

## Diagnostyka serologiczna (immunodiagnostyka)

Niekiedy zastosowanie klasycznych metod diagnostycznych jest zbyt czasochłonne lub wręcz niemożliwe, ponieważ nie wszystkie bakterie dają się hodować na podłożach sztucznych (np. *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia* spp.). Także leczenie, wprowadzone przed pobraniem materiału do badań mikrobiologicznych, może przyczynić się do uzyskania wyniku fałszywie ujemnego w hodowli. Wtedy bardzo przydatna okazuje się diagnostyka serologiczna.

Opiera się ona na metodach immunologicznych wykorzystujących podstawową reakcję immunologiczną pomiędzy antygenem i rozpoznającym go swoistym przeciwciałem, czyli reakcją antygen–przeciwciało. Metody serologiczne, powszechnie używane w diagnostyce mikrobiologicznej, wykorzystują przeciwciała monoklonalne (ang. *monoclonal antibody*, mAb) skierowane przeciwko jednej konkretnej determinancie antygenowej, czyli epitopowi. Czasem są to przeciwciała poliklonalne, skierowane przeciwko wielu różnym epitopom antygenów drobnoustroju (np. całym komórkom bakteryjnym, toksynom wydzielanym zewnątrzkomórkowo, antygenom powierzchniowym, jak wielocukry otoczkowe, białka powierzchniowe, wewnątrzkomórkowe ciała wtętowe). Wykorzystuje się również przeciwciała skierowane przeciwko przeciwciałom wytworzonym w organizmie w odpowiedzi na zakażenie (Gołąb i in., 2017).

W piśmiennictwie za diagnostykę serologiczną często uznaje się tylko wykrywanie przeciwciał, natomiast wykrywanie antygenów jest zaliczane do szeroko pojętej immunodiagnostyki.

Metody serologiczne umożliwiają wykrycie reakcji antygen–przeciwciało w dwojaki sposób. Jest to możliwe przez bezpośrednią obserwację (gołym okiem lub dzięki odpowiedniemu mikroskopowi) określonej reakcji. Dotyczy to reakcji precypitacji (precypitacja, immunodyfuzja), aglutynacji (aglutynacja, hemaglutynacja, hemadsorpcja, odczyn zahamowania hemaglutynacji), lizy erytrocytów (odczyn wiązania dopełniacza), zahamowania efektu cytopatycznego w hodowli komórkowej (odczyn neutralizacji). Można to też uczynić poprzez zastosowanie odpowiednich znaczników, tj. koloidalnych cząsteczek metali ciężkich (immunochromatografia), fluorescencyjnych (immunofluorescencja, cytometria przepływowa), enzymatycznych (ELISA, western blotting), radioaktywnych, luminescencyjnych, chemiluminescencyjnych (powszechne w metodach zautomatyzowanych) (Shojaeian i in., 2018).

Metody bezpośrednie służą zwykle do oceny jakościowej („jest” lub „nie ma”) wykrywanego parametru, rzadziej półilościowej (przez wyznaczenie miana). Miano to najmniejsze stężenie (największe rozcieńczenie) próbki, w którym widoczna jest reakcja między antygenem a swoistym do niego przeciwciałem.

Metody z zastosowaniem znaczników umożliwiają precyzyjną ocenę jakościową (immunochromatografia, western blotting), półilościową (miano, immunofluorescencja) lub ilościową poszukiwanych antygenów czy przeciwciał, zależnie od potrzeb (Murray i in., 2016). W laboratoriach zajmujących się rutynową diagnostyką coraz powszechniej wykorzystuje się systemy zautomatyzowane (np. VIDAS BioMérieux, Architect Abbott Laboratories), w których oznaczenia są wykonywane z zastosowaniem różnorodnych metod immunologicznych.

### PRECYPITACJA (ang. *precipitation*, P)

Reakcja między cząsteczką swoistego przeciwciała i rozpuszczalnego antygeny, zachodząca w środowisku płynnym. Powstające w strefie ekwiwalencji (równowagi stężeń obu reagentów) kompleksy immunologiczne ulegają wytrąceniu w postaci widocznych gołym okiem precypitatów.

Precypitacja wykorzystywana jest do oznaczeń ilościowych, czyli oceny poziomu przeciwciał (precypityn) w surowicy pacjenta przez określenie miana precypitacyjnego (np. nieswoiste testy kłaczkujące w diagnostyce kiły: VDRL, ang. *veneral disease research laboratory*, RPR, ang. *unheated serum reagin*) (Solaimalai i in., 2020), oraz oznaczeń jakościowych, czyli wykrywania antygenów przy użyciu wzorcowych przeciwciał (np. test Eleka w diagnostyce błonicy) (Kuklińska i Chodorowska, 2002; Efstratiou i in., 2000), lub wykrywania przeciwciał w surowicach badanych przy użyciu wzorcowego antygeny.

#### IMMUNODYFUZJA (ang. *immunodiffusion*, D)

Jest to reakcja precypitacji zachodząca w środowisku żelowym, oparta na zjawisku dyfuzji cząsteczki antygeny i przeciwciała w żelu (Gołąb i in., 2017). Precypitat ma postać linii, łuków lub pierścienia precypitacyjnego. Wyróżniamy immunodyfuzję pojedynczą (dyfunduje tylko jeden z reagentów, zwykle antygen, a drugi z nich, przeciwciało, występuje w żelu w jednakowym stężeniu; test służy do ilościowej oceny antygenów, np. immunodyfuzja radialna) i immunodyfuzję podwójną (zarówno antygeny, jak i przeciwciała dyfundują w żelu; test pozwala określić, czy badane antygeny zawierają identyczne, wspólne czy też różne epitopy, ocena ta ma charakter jakościowy).

#### AGLUTYNACJA (ang. *agglutination*, A)

Jeśli reakcja ta zachodzi bezpośrednio pomiędzy swoistymi przeciwciałami a antygenami upostaciowanymi, wchodzącymi w skład np. otoczek komórek bakteryjnych, erytrocytów czy innych komórek ludzkich, to określa się ją mianem aglutynacji bezpośredniej. Wykorzystywana jest ona m.in. do identyfikacji *Staphylococcus aureus* (Essers i Radebold, 1980), *Streptococcus* grupy A i B (Lennette i in., 1985), *Haemophilus influenzae* (Heikkilä i in., 1987), diagnostyki duru brzuszego odczynem Widala (Kuchar i Kacprzak-Bergman, 2004), diagnostyki duru płamistego odczynem Weila–Felix (Davis i Parker, 1938). Aglutynacja może zachodzić również między swoistymi przeciwciałami i antygenami rozpuszczalnymi, opłaszczonymi na cząstkach lateksu – określa się ją wtedy mianem aglutynacji pośredniej lub lateksowej. Aglutynacja lateksowa znalazła zastosowanie np. w diagnostyce w kierunku rotawirusów (Thomas i in., 1994), wirusa różyczki (Ferraro i in., 1987), wirusa Epsteina–Barr w mononukleozie zakaźnej (Levey i in., 1980).

Komórki czy kulki lateksu z przyłączonymi przeciwciałami (czyli aglutyninami) tworzą przestrzenne agregaty, wytrącające się z roztworu w postaci aglutynatu (strontu). Zaletą metody jest prostota jej wykonania, szybkość wystąpienia reakcji (kilka minut), łatwość odczytania wyniku i stosunkowo wysoka czułość (wykrywa już ok.  $10^3$ – $10^4$  pg antygenów w 1 ml). Oznaczenie wykonuje się najczęściej na szkiełkach mikroskopowych, płytkach z ciemnego szkła lub specjalnych kartach dołączonych do zestawu diagnostycznego.

Odmianą aglutynacji jest hemaglutynacja (ang. *haemagglutination*, H), czyli reakcja aglutynacji czerwonych krwinek. W hemaglutynacji bezpośredniej (czynnej) zlepianie erytrocytów jest wywoływane przez drobnoustroje (wykorzystuje się to np. w diagnostyce kiły). Zjawisko to może być również zahamowane (odczyn zahamowania hemaglutynacji, OZHA) działaniem surowicy zawierającej swoiste przeciwciała, skierowane przeciwko drobnoustrojom zlepiającym krwinki czerwone (metoda wykorzystywana jest do identyfikacji drobnoustrojów posiadających hemaglutyniny zdolne do zlepiania erytrocytów, np. wirusa grypy, wirusa różyczki, paramyksowirusa) (Killian, 2020). Hemaglutynacja pośrednia (bierna) zachodzi, gdy na erytrocyty opłaszczony antygenami zadziałamy surowicą odpornościową, zawierającą swoiste przeciwciała dla antygenów zaadsorbowanych na powierzchni krwinki (metoda ta wykorzystywana jest do oceny miana przeciwciał w surowicy pacjenta, np. w diagnostyce kiły testem TPHA (ang. *Treponema pallidum haemagglutination assay*, Levchik i in., 2015).

#### IMMUNOCHROMATOGRAFIA (ang. *immunochromatography*, IC)

W praktyce stosuje się szybkie testy diagnostyczne, tzw. przyłóżkowe, pozwalające w ciągu 15–30 minut potwierdzić obecność antygenów bakteryjnych lub wirusowych bezpośrednio w materiale klinicznym pobranym od pacjenta, np. w wymazach z jamy nosowo-gardłowej – wirusa grypy, wirusa SARS-CoV-2 (ang. *severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2*) czy w kale – antygenów *Clostridium difficile* lub rotawirusów (Żeromski i in., 2017).

Test immunochromatograficzny, podobnie jak test aglutynacji, wykrywa już ok.  $10^3$ – $10^4$  pg antygenów w 1 ml próbki. Test występuje w postaci płytki z wyznaczonym miejscem, na które nanosi się kroplę próby badanej, uprzednio wymieszanej z buforem. Pozytywna reakcja uwidoczni się w postaci barwnej linii lub kropki.

Metoda, przeznaczona do stosowania w ostrej fazie infekcji, jest bardzo łatwa do wykonania i odczytania, nie wymaga specjalistycznego sprzętu czy skomplikowanej analizy wyników. Pozwala również na wykrywanie przeciwciała, czyli immunoglobuliny (ang. *immunoglobulin*, Ig) klasy M (IgM) i klasy G (IgG), po bezpośrednim dodaniu kropli krwi do studzienki reakcyjnej testu w celu oceny odpowiedzi immunologicznej na infekcję, jak np. w diagnostyce serologicznej zakażeń wywołanych przez SARS-CoV-2 (Pegoraro i in., 2020).

Ważne, aby zwrócić uwagę, co wykrywamy danym testem – antygeny czy przeciwciała. Ma to ogromne znaczenie podczas interpretacji wyniku badania.

#### ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

To metoda ilościowa, należąca do grupy testów fazy stałej, zaliczana do technik immunoenzymatycznych (ang. *enzyme immunoassay*, EIA). Jest jednym z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach diagnostycznych. Wykorzystuje wyznakowane enzymem przeciwciała lub antygeny, zależnie od zastosowanego testu (Gołąb i in., 2017).

Aby można było zaobserwować reakcję antygen–przeciwciało, w jednym z ostatnich etapów badania dodaje się substrat dla enzymu (np. substratem dla peroksydazy chrzanowej jest  $H_2O_2$ ) oraz chromogen zależny od użytego do znakowania enzymu, dzięki czemu powstaje barwny produkt. Do odczytu wyników stosuje się spektrofotometryczną ocenę intensywności barwy (rzadko dokonuje się wizualnej oceny jakościowej). W klasycznej metodzie ELISA intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości poszukiwanego antygeny czy przeciwciała.

ELISA to metoda pracochłonna, w której wynik uzyskuje się zwykle po kilku godzinach. Służy do wykrywania i oznaczania nawet bardzo niskich stężeń antygeny (kilka, kilkadziesiąt pg antygeny w 1 ml) w płynach ustrojowych. Wykorzystywana jest też do oceny odporności humoralnej (ocena stężenia immunoglobulin w surowicy, ocena stężenia poszczególnych składników układu dopełniacza). Rutynowo stosuje się ją w diagnostyce zakażeń np. cytomegalowirusem, ludzkim wirusem niedoboru odporności (*Human immunodeficiency virus*, HIV), wirusem zapalenia wątroby typu A (*Hepatitis A virus*, HAV), *Clostridioides difficile* (Żeromski i in., 2017).

#### METODA RADIOIMMUNOLOGICZNA (ang. *radioimmunoassay*, RIA)

Metoda ta pozwala wykryć reakcję antygeny ze swoistym dla niego przeciwciałem w oparciu o pomiar radioaktywności izotopu promieniotwórczego, którym wyznakowany jest jeden z reagentów. Jest to technika ilościowa, wysoce czuła (wykrywa nawet kilka pg antygeny w 1 ml) i swoista (Gołąb i in., 2017). Wymaga jednak stosowania podwyższonych środków ostrożności oraz specjalistycznego sprzętu. Obecnie, w rutynowej diagnostyce, RIA została wyparta przez metodę ELISA i techniki biologii molekularnej, gdzie wyeliminowano sygnał radioaktywny.

#### IMMUNOFLUORESCENCJA (ang. *immunofluorescence*, IF)

Stosuje się dwa warianty metody IF z oceną w mikroskopie fluorescencyjnym (rzadziej konfokalnym):

- bezpośrednią: wykrywającą określony antygen przy pomocy znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał – metoda detekcji antygenów wirusowych lub bakteryjnych bezpośrednio z izolowanych od pacjenta próbek klinicznych, np. w kierunku *Chlamydia trachomatis* (Abdelfattah i in., 2016),
- pośrednią – wykrywającą przy pomocy znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał immunoglobuliny pacjenta, które uprzednio swoiście związały antygeny wzorcowe; metoda ta jest wykorzystywana np. w serodiagnostyce kiły (Park i in., 2020) oraz mononukleozy zakaźnej (Corrales i in., 2014).

Mimo iż metody IF charakteryzuje większa czułość i swoistość w porównaniu z IC i ELISA, interpretacja wyników wymaga dużego doświadczenia, jest subiektywna i może być bardziej czasochłonna (Sguassero i in., 2015).



## WESTERN BLOT (*western blotting*, WB)

Metoda składa się z kilku etapów. W pierwszym etapie następuje rozdział elektroforetyczny antygenów według mas relatywnych, w drugim natomiast – po przeniesieniu ich na membranę (zwykle nitrocelulozową) – dodawana jest surowica badana, w której poszukuje się przeciwciał swoistych dla rozdzielonych antygenów (przeciwciała pierwszorzędowe). Aby uwidocznić powstające na membranie kompleksy immunologiczne, dodaje się kolejne przeciwciało (drugorzędowe), wyznakowane np. enzymem, wraz z substratem dla niego oraz chromogenem, warunkującym powstawanie barwnego, nierozpuszczalnego produktu. Pojawiające się barwne prążki świadczą o obecności w materiale klinicznym swoistych przeciwciał. W rutynowej diagnostyce chorób infekcyjnych pierwszy etap tej metody jest wykonany przez producenta testu dostępnego komercyjnie, kolejne wykonywane są w laboratorium mikrobiologicznym lub immunologicznym i trwają zwykle ok. 2–3 godzin.

Zastosowanie znalazł również wariant metody, gdzie w drugim etapie dodawane są przeciwciała wyznakowane np. fluorochromem, swoiste do antygenów poszukiwanych w badanym materiale, rozdzielonych w pierwszym etapie. Prążki uwidocznione w teście, w świetle ultrafioletowym, świadczą o wykryciu antygenów drobnoustroju w materiale klinicznym. Tego typu badanie można przeprowadzić w wyspecjalizowanej pracowni biologii molekularnej.

WB to metoda bardziej czuła i swoista niż IF i ELISA. Wykorzystuje się ją np. w diagnostyce zakażeń wywoływanych przez *Borrelia burgdorferi*, wirusa Epsteina–Barr, HIV (Bryniarski, 2018; Wormser i in., 1987).

WB, inaczej immunoblot (ang. *immunoblotting*, IB), to metoda wykorzystująca zarówno techniki biologii molekularnej (rozdzielanie antygenów), jak i metody immunologiczne (oparte o reakcję antygen–przeciwciało), dlatego odniesienie do niej znajduje się także w dalszej części rozdziału.

## CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA (ang. *flow cytometry*, FC)

Metoda wykorzystywana do oznaczania markerów powierzchniowych komórek, co jest możliwe dzięki zastosowaniu mAb wyznakowanych fluorochromami, skierowanych przeciwko antygenom różnicowania obecnym na komórkach (ang. *cluster of differentiation*, CD). Odgrywa zasadniczą rolę w fenotypowaniu komórek immunokompetentnych człowieka.

W tej metodzie przeprowadza się analizę wieloparametrową pojedynczych komórek, które są zliczane w wyspecjalizowanym aparacie. Sygnał fluorescencyjny z pobudzonych przez laser fluorochromów jest przetwarzany przez zaawansowany układ elektroniki na cyfrowy. Dzięki temu wyniki badania są przedstawiane w postaci wykresów (cytogramów) z bardzo precyzyjną oceną liczby komórek związanych przez mAb.

Metoda wykorzystywana jest rutynowo np. w monitorowaniu poszczególnych populacji leukocytów pacjentów zakażonych HIV, głównie subpopulacji limfocytów T o fenotypie CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> (Robinson, 2018; Huang i in., 2020).

## ODCZYN NEUTRALIZACJI (odczyn zobojętniania; ang. *neutralization test*, NT)

Najczulszy test służący do oceny humoralnej odpowiedzi pacjenta na zakażenie wirusowe. Istotą odczynu jest zneutralizowanie wzorcowego wirusa przez przeciwciała obecne w surowicy pacjenta (Gołąb i in., 2017). Jeśli pacjent miał wcześniej kontakt z podobnym wirusem i wytworzył swoiste przeciwciała, wirus zastosowany w badaniu laboratoryjnym utraci właściwości zakaźne. Wynik reakcji zobojętniania ocenia się przez zakażenie wrażliwej hodowli komórkowej lub zwierząt laboratoryjnych mieszaniną wirusa poddaną wcześniej działaniu immunoglobulin (surowicy pacjenta). Odczyn uznaje się za dodatni, gdy nie pojawia się efekt cytopatyczny po zakażeniu hodowli lub gdy brak jest objawów choroby u zakażonych zwierząt. Konieczne jest równoczesne wykonanie kontroli z wykorzystaniem czystej zawiesiny wirusa (bez surowicy pacjenta), w której powinien być obserwowany efekt działania wirusa. Odczyn stosowany jest np. w diagnostyce zakażeń pikornawirusami, takimi jak rinowirusy i enterowirusy (wirusy Coxsackie A i B, wirusy ECHO – z ang. *enteric cytopathic human orphan*) (Jaguś i in., 2010).

#### ODCZYN HEMADSORPCJI (ang. *haemadsorption*, HA)

Metoda wykorzystuje zjawisko przylegania erytrocytów (hemaglutynacji) do powierzchni komórek zakażonych wirusem, który przyczynia się do wytwarzania hemaglutynin wirusowych przez komórki gospodarza i wbudowywania ich w błonę cytoplazmatyczną. W zakażonych przez wirusa komórkach efekt ten pojawia się dużo wcześniej niż efekt cytopatyczny. Metoda pozwala na pośrednie wykrycie wirusa u pacjenta. Dodanie zawiesiny czerwonych krwinek do wzorcowej hodowli komórkowej zakażonej wirusem pozwala sprawdzić, czy jest to wirus hemaglutynujący. Adsorpcja erytrocytów do powierzchni komórek jest widoczna w postaci tzw. kiści winogron. Zahamowanie odczynu hemadsorpcji, poprzez wcześniejsze dodawanie surowic odpornościowych swoistych do konkretnego typu wirusa do poszczególnych prób badanych, umożliwia identyfikację gatunkową wirusa. Odczyn stosowany jest np. w diagnostyce zakażeń ortomyksowirusowych (Luo i in., 1999).

#### ODCZYN WIĄZANIA DOPEŁNIACZA (OWD)

OWD wykorzystuje zdolność białek dopełniacza do wywołania lizy komórek opłaszczonych przez przeciwciała wiążące dopełniacz, a konkretnie kompleksu: erytrocyt – swoiste przeciwciało. Badanie wykonuje się w dwóch układach: testującym (surowica badana z dopełniaczem zainaktywowanym w temp. 56°C oraz antygenem wirusowym lub bakteryjnym i dopełniaczem) i wskaźnikowym (erytrocyty – np. królicze oraz swoiste przeciwciała przeciwko erytrocytom). Po inkubacji układu testującego dodaje się go do układu wskaźnikowego i ocenia, czy doszło do hemolizy erytrocytów. Brak hemolizy świadczy o obecności poszukiwanych przeciwciał w materiale badanym. Odczyn jest pracochłonny, wypierany przez metody szybsze i prostsze, bardziej czułe i swoiste (Bryniarski, 2018; Jaguś i in., 2010).

### **Kinetyka powstawania przeciwciał**

Obecność antygenów, np. zakaźnych cząstek wirusa, jego białek lub kwasu nukleinowego, często można wykazać tylko na początku infekcji, natomiast w późniejszym okresie rozpoznanie ustala się na podstawie oznaczenia swoistych przeciwciał.

Obecność immunoglobulin w surowicy pacjenta wskazuje pośrednio na wcześniejszy kontakt z antygenem – za wyjątkiem noworodków i niemowląt, u których można wykryć IgG i IgA matczyne, ponieważ immunoglobuliny te przechodzą przez łożysko i przedostają się wraz z mlekiem.

Po pierwszym kontakcie z antygenem wnikającym do organizmu (odpowiedź pierwotna), po ok. 4–7 dniach od zakażenia, zaczynają powstawać IgM, charakteryzujące się małą siłą wiązania antygeny (tzw. powinowactwo, ang. *affinity*) i dużą zachłannością (tzw. awidność, ang. *avidity*), wynikającą z budowy pentamerowej tych przeciwciał. Po pojawieniu się IgM w układzie krążenia zaczynają powstawać również IgG (ok. 10–14 dnia infekcji). Początkowo miano IgM jest wyższe w stosunku do miana IgG, natomiast później dominują IgG. Efektem swoistej odpowiedzi pierwotnej jest także powstawanie limfocytów B pamięci, które pozostają w krążeniu przez wiele lat po ustąpieniu infekcji (Bryniarski, 2018).

Po kolejnym kontakcie organizmu z tym samym antygenem (odpowiedź wtórna), dzięki obecnym w układzie krążenia komórkom pamięci, szybko aktywowana jest odpowiedź, w której od początku zdecydowanie przeważają IgG nad IgM. Miano IgG w odpowiedzi wtórnej jest dużo wyższe niż w pierwotnej (o kilka rzędów wielkości), a same przeciwciała – wraz z upływem czasu trwania zakażenia – stają się coraz lepiej dopasowane do antygenów (wyższy stopień zarówno powinowactwa, jak i zachłanności) (Male i in., 2008).

W praktyce klinicznej wykorzystywana jest przede wszystkim ocena awidności IgG (a nie powinowactwa) z uwagi na występowanie w warunkach fizjologicznych głównie złożonych antygenów (czyli tzw. antygenów wielowartościowych). Czas potrzebny na przejście awidności IgG z niskiej do wysokiej to ok. 12–16 tygodni. Ta wiedza pozwala stwierdzić, że jeśli w surowicy pacjenta są obecne IgG o wysokiej zachłanności, to zakażenie miało miejsce przynajmniej 3–4 miesiące wcześniej (Prince i Lapé-Nixon, 2014).

W odpowiedzi wtórnej pojawiają się również IgA. Ich poziom w surowicy jest niski, występują głównie jako monomery. Natomiast większość IgA jest wytwarzana w formie dimerów w błonach śluzowych i uwalniana do wydzielin (przewodu pokarmowego, dróg oddechowych, dróg moczowych, a także łez i potu) – są to tzw. wydzielnicze IgA (ang. *secretory IgA*, sIgA).

Należy podkreślić, że znaczenie i synteza IgA zależą od drogi wnikania czynnika etiologicznego infekcji. Jeśli patogen dostaje się do organizmu przez błony śluzowe, wtedy powstają przede wszystkim sIgA. Ich stężenie jest bardzo wysokie i odgrywają one zasadniczą rolę w miejscowej, humoralnej odpowiedzi swoistej. Jeśli jednak drobnoustroj wnika inną drogą, np. krwiopochodną, to sIgA nie powstają, a kluczową rolę w odpowiedzi obronnej pełnią w tym przypadku surowicze IgG odpornościowe, których jest najwięcej. Wykorzystywane jest to m.in. w immunoprofilaktyce z zastosowaniem preparatów szczepionkowych podawanych drogą inną niż dośluzówkowa (donosowa, doustna).

Wiedza na temat kinetyki powstawania wyżej opisanych przeciwciał jest przydatna diagnostycznie i może posłużyć do określenia etapu trwania infekcji (wczesna, ostra, przewlekła, reinfekcja) lub wskazania, że pacjent jest w fazie zdrowienia, a także do monitorowania miana przeciwciał odpornościowych po szczepieniu. Warto pamiętać, że w diagnostyce serologicznej ocena miana IgA jest wykorzystywana zdecydowanie rzadziej niż IgM i IgG i służy przede wszystkim do różnicowania wybranych zakażeń naturalnych od odpowiedzi poszczepiennej, w wyniku której IgA zwykle nie powstają (jedynie w surowicy, w bardzo małych ilościach, przez co nie odgrywają istotnej funkcji obronnej) z uwagi na inną niż naturalna (dośluzówkowa) drogę podania szczepionki, np. domięśniową, podskórną (Male i in., 2008).

W diagnostyce serologicznej ostrych zakażeń bardzo dużą wartość mają badania wykonywane co najmniej dwukrotnie, w odstępach 2–3 tygodni (tzw. badanie surowic parzystych). Umożliwia to ocenę dynamiki zmian poziomu przeciwciał w celu potwierdzenia lub wykluczenia serokonwersji (tj. znaczącego wzrostu miana IgM/IgG w surowicy pacjenta w odniesieniu do miana przeciwciał oznaczonego 2–3 tygodnie wcześniej). Uchwycenie serokonwersji jest możliwe, jeśli uda się wykonać badanie w ostrej fazie choroby i później (Male i in., 2008).

W Tabeli 4 zestawiono najczęściej spotykane układy wyników badań w kierunku swoistych IgM i IgG.

**Tabela 4.** Zestawienie najczęściej spotykanych układów wyników badań w kierunku swoistych IgM i IgG (De Paschale i Clerici, 2012; Alley i in., 2016).

<b>Swoiste przeciwciała</b>	<b>Potencjalne możliwości interpretacji wyników</b>
IgM (-), IgG (-)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brak dowodów na: trwające zakażenie, uprzednie zakażenie lub szczepienie</li> <li>• pacjent jest wrażliwy na zakażenie</li> <li>• okienko serologiczne – okres następujący tuż po zakażeniu, w którym testy w kierunku poszukiwanego patogenu pozostają ujemne z powodu braku przeciwciał lub antygenów lub ich bardzo niskiego poziomu (poniżej progu wykrywalności testu); wymagane jest zbadanie kolejnej próbki surowicy krwi</li> </ul>

**Tabela 4.** Zestawienie najczęściej spotykanych układów wyników badań... (cd.)

IgM (+), IgG (-)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• możliwe zakażenie pierwotne</li> <li>• niedawno wykonane szczepienie (pierwsza dawka)</li> <li>• zależnie od danych klinicznych może być wymagane wykonanie badania powtórnego, aby wykluczyć wyniki fałszywie dodatnie</li> </ul>
IgM (+), IgG (+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niedawno przebyte lub trwające zakażenie (pomocna ocena awidności IgG)</li> <li>• niedawno przebyte szczepienie</li> <li>• reinfekcja lub reaktywacja wirusa latentnego (np. wirusa ospy wietrznej)</li> </ul>
IgM (-), IgG (+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• przebyte w przeszłości zakażenie</li> <li>• immunizacja (pacjent jest odporny na zakażenie)</li> <li>• w przypadku zakażeń przewlekłych (np. HIV czy wirusem zapalenia wątroby typu C) – trwające zakażenie</li> </ul>

## Diagnostyka molekularna

Poza niewątpliwymi zaletami, metody immunologiczne w wykrywaniu antygenów bakteryjnych czy wirusowych mają także pewne wady, np. niską czułość. W materiale badanym musi znajdować się zazwyczaj przynajmniej  $10^4$ – $10^5$  drobnoustrojów w 1 ml, aby wynik badania był wiarygodny. Dlatego też opracowano metody o znacznie wyższej czułości, opierające się na wykrywaniu genomu drobnoustrojów nawet w sytuacji, gdy w 1 ml badanego materiału obecnych jest zaledwie  $10^1$ – $10^2$  patogenów. Poza tym czas badania jest stosunkowo krótki. Dodatkowo metody genetyczne dały możliwość wykrywania drobnoustrojów, których nie da się hodować *in vitro* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Techniki molekularne wykorzystywane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej (Baj, 2018; Reta i in., 2020).

Technika molekularna	Co wykrywa
RFLP	DNA, rDNA (ang. <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i> ), mobilne DNA (plazmidy, transpozony)
FISH	DNA, RNA
northern blotting	RNA
southern blotting	DNA
PCR	DNA lub cDNA (ang. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
real-time PCR	DNA lub cDNA (ocena jakościowa i ilościowa)
multiplex PCR	kilka patogenów w jednej reakcji

**Tabela 5.** Techniki molekularne wykorzystywane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej... (cd.)

nested PCR	DNA (wyższa czułość w porównaniu do zwykłej reakcji PCR)
RT-PCR (ang. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )	RNA
WB	białka
mikromacierze białkowe	białka

Należy pamiętać, że aby posłużyć się wymienionymi metodami biologii molekularnej, wymagane jest bardzo specjalistyczne i kosztowne wyposażenie laboratorium oraz odpowiednio przeszkolony w tym zakresie personel. W efekcie powyższe techniki diagnostyczne są zazwyczaj dostępne tylko w dużych lub referencyjnych laboratoriach. Ponadto bardzo wysoka czułość metod może przyczyniać się do uzyskiwania dużego odsetka wyników fałszywie dodatnich, np. z powodu wykrywania DNA z zanieczyszczonej próbki. Wadą jest także konieczność ustalenia z góry, jakiego konkretnie drobnoustroju poszukujemy.

Przy świadomości zarówno ogromnych zalet, jak i ograniczeń metod genetycznych trzeba pamiętać o krytycznym podejściu do otrzymanych wyników i konieczności stosowania innych metod do potwierdzenia oraz uzupełnienia diagnostyki. Zasada ta powinna dotyczyć wszystkich technik immunologicznych i genetycznych.

#### BADANIE POLIMORFIZMU DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH

(ang. *restriction fragments length polymorphism*, RFLP)

Technika ta polega na cięciu na mniejsze części fragmentu DNA zamplifikowanego w reakcji PCR. Wykorzystywane są w tym celu enzymy restrykcyjne (endonukleazy, restryktazy), rozpoznające – w obrębie badanego genu – swoiste sekwencje nukleotydowe i tnące nić DNA w określonym miejscu. Dany enzym restrykcyjny zawsze tnie DNA w tym samym miejscu, bo zawsze rozpoznaje tę samą sekwencję DNA, jednak kwas nukleinowy różnych szczepów drobnoustrojów, nawet tego samego gatunku (z uwagi na różnice w genomie), będzie pocięty na fragmenty różnej długości. Uzyskane z analizowanych próbek „wzory” fragmentów DNA, po przeprowadzonej elektroforezie (czyli rozdzieleniu uzyskanych fragmentów restrykcyjnych DNA w żelu), są porównywane, by ustalić, czy to ten sam szczep drobnoustroju, czy może jednak szczepy patogenów obecnych w analizowanych próbkach są różne, a zatem niespokrewnione genetycznie. Analiza sekwencji kwasów nukleinowych i możliwość wyznaczenia pokrewieństwa filogenetycznego drobnoustrojów znalazły zastosowanie w epidemiologii zakażeń (Riley i Blanton, 2018).

#### HYBRYDYZACYJNE METODY ANALIZY KWASÓW NUKLEINOWYCH – FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA *IN SITU*

(ang. *fluorescent in situ hybridization*, FISH)

Metoda polega na spontanicznym związaniu komplementarnej sondy DNA, wyznakowanej fluoro-chromem, z określonym fragmentem DNA lub RNA w materiale badanym. Sondy DNA rozpoznają określone sekwencje nukleotydowe równie swoiście, jak mAb rozpoznają epitopy antygenowe. *Southern blotting* służy do detekcji określonych fragmentów DNA po pocięciu DNA enzymami restrykcyjnymi lub po PCR, natomiast *northern blotting* służy do detekcji RNA, głównie mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*) genów, ulegających transkrypcji w komórce (badanie aktywności pojedynczych genów) (Frickmann i in., 2017).

W diagnostyce mikrobiologicznej stosuje się głównie techniki pozwalające na powielanie genów bez ich klonowania, czyli oparte na PCR. Dochodzi do wielokrotnego powielania dowolnej sekwencji DNA z wykorzystaniem starterów, czyli krótkich oligonukleotydów DNA, których sekwencja jest komplementarna do końcowych sekwencji powielanego (amplifikowanego) fragmentu DNA (Drewa i Ferenc, 2011; Kuypers i Jerome, 2017). W mieszaninie reakcyjnej muszą się znaleźć:

- DNA wyizolowane z badanej próbki (z hodowli drobnoustroju lub materiału bezpośrednio pobranego od pacjenta),
- nadmiar nukleotydów i starterów reakcji,
- termostabilna polimeraza.

PCR składa się z następujących, wielokrotnie powtarzanych, etapów (30–40 cykli):

- termicznej denaturacji DNA badanego w temp. ok. 95°C,
- przyłączania starterów do matrycy w temperaturze zależnej od temperatury topnienia starterów i zbliżonej do niej,
- syntezy nowych nici DNA w temp. 68–72°C (tj. amplifikacji szukanego fragmentu DNA).

Każdy etap PCR jest prowadzony równolegle dla badanych próbek oraz kontroli pozytywnej i negatywnej. Próbka jest następnie poddawana elektroforezie w celu uwidocznienia w żelu obecności cząsteczek DNA o określonej wielkości.

Natomiast PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) to odmiana PCR przeprowadzana w specjalnych aparatach i z zastosowaniem wyznakowanych fluorochromami sond, umożliwiających monitorowanie ilości amplikonów powstających w czasie przebiegu reakcji PCR (poprzez pomiar intensywności fluorescencji próbki, proporcjonalnej do ilości powstałego produktu). Obie odmiany metody – PCR i *real-time PCR* – są obecnie stosowane do stwierdzenia obecności i liczby drobnoustrojów w badanej próbce (np. we krwi, w płynie mózgowo-rdzeniowym) oraz stwierdzenia obecności w badanym materiale genów kodujących toksyny bakteryjne lub też genów kodujących komponenty, które warunkują istotne mechanizmy oporności na antybiotyki (Mackay, 2004).

W ostatnim czasie pojawiły się także zautomatyzowane, zamknięte, łatwe w obsłudze i interpretacji zestawy reakcyjne do analizy PCR w czasie rzeczywistym (np. BD Max, GeneXpert Cepheid), umożliwiające wykrycie drobnoustrojów w czasie ok. 1–2 godzin, bezpośrednio w materiale pobranym od pacjenta. Multiplex PCR wykorzystuje przynajmniej 2 pary starterów, co umożliwia amplifikację przynajmniej dwóch swoistych fragmentów DNA jednocześnie, np. BioFire. Nested PCR (zagnieżdżony PCR lub wewnętrzny PCR) to metoda polegająca na wykorzystaniu dwóch par oligonukleotydowych starterów do przeprowadzenia dwuetapowej amplifikacji. Produkty uzyskane w pierwszym etapie stanowią matrycę do przeprowadzenia kolejnej reakcji PCR, w której druga para starterów amplifikuje wewnętrzny fragment pierwszego amplikonu. Metoda ta, charakteryzująca się zwiększoną wrażliwością i wysoką specyficnością, jest stosowana do amplifikacji niskiej ilości kopii patogenu w materiale klinicznym, tj. krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. RT-PCR to PCR połączony z odwrotną transkrypcją. Wykorzystuje odwrotną transkryptazę, która ma za zadanie przepisać RNA lub mRNA na cDNA przed właściwą reakcją PCR (Murray i in., 2016).

#### MIKROMACIERZE

Mikromacierze DNA (chipy DNA) są opracowywane do detekcji istotnych klinicznie gatunków i szczepów bakterii. Mikromacierz to płytka szklana lub plastikowa z fragmentami jednoniciowych cząsteczek DNA naniesionymi w regularnym układzie, stanowiącymi sondy genetyczne (tysiące na jednej płytce), które w wyniku hybrydyzacji wykrywają komplementarne do siebie cząsteczki DNA lub RNA (Drewa i Ferenc, 2011). Jeśli zaprojektowane sondy będą rozpoznawały geny warunkujące oporność na leki czy kodujące czynniki wirulencji, możliwa będzie jednocześnie, obok identyfikacji patogenu, także ocena jego właściwości chorobotwórczych i wrażliwości na leki.

Mikromacierze białkowe działają natomiast na zasadzie metody immunologicznej, w której umieszcza się przeciwciała wychwytyjące odpowiednie białko w materiale badanym. Tworzone są także mikromacierze mieszane, poszukujące jednocześnie genów i białek. Obecnie mikromacierze białkowe są wykorzystywane głównie do badania ekspresji genów i nie są stosowane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej (Reta i in., 2020).

#### TYPOWANIE BAKTERIOFAGOWE

Bakteriofagi to wirusy bakteryjne zbudowane z kwasów nukleinowych (DNA, rzadziej RNA) i białek (Murray i in., 2016). Najczęściej charakteryzują się złożoną strukturą, w której wyróżniamy główkę z upakowanym genomem, kołnierzyk, ogonek oraz płytkę podstawną z wbudowanymi w nią dwuczłonowymi wypustkami, pełniącymi funkcje receptorowe, a także innymi komponentami białkowymi, które mogą np. warunkować lizę ściany komórkowej prokariotów.

Bakteriofagi są zwykle wysoce swoiste gatunkowo, a niektóre z nich są w stanie zakazić wyłącznie określone szczepy bakteryjne. Typowy, lityczny cykl życiowy bakteriofaga składa się z następujących etapów:

- przyłączenia bakteriofaga do receptorów na powierzchni komórki bakteryjnej,
- wstrzyknięcia DNA do cytoplazmy komórki bakteryjnej (bez kapsydu),
- replikacji DNA bakteriofaga oraz syntezy białek kapsydu,
- powstawania nowych (potomnych) cząstek bakteriofagowych,
- uwolnienia bakteriofagów potomnych po lizie komórki bakteryjnej.

Niektóre bakteriofagi, tzw. łagodne, mogą przechodzić w stan lizogenii. Proces polega na wbudowaniu się DNA bakteriofaga do chromosomu bakteryjnego (najczęściej w ściśle określonej lokalizacji) i replikacji wbudowanego bakteriofaga (czyli profaga) wraz z chromosomem bakteryjnym. Spontanicznie lub pod wpływem różnorodnych bodźców (np. wysokiej temperatury, promieniowania, reaktywnych form tlenu) profagi mogą przejść w cykl lityczny, którego efektem jest rozpad komórki gospodarza, czyli bakterii. Bakteriofagi łagodne mogą zawierać w swoim DNA, oprócz informacji o budowie białek wirusa, także geny kodujące czynniki zjadliwości bakterii, np. toksyny *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae* (Safa i in., 2020; Welkos i in., 1981). Dzięki temu (dopiero po integracji bakteriofaga z bakteryjnym chromosomem) bakteria jest zdolna do wytwarzania toksyny. Bakteriofagi znalazły zastosowanie w typowaniu różnych gatunków bakterii (np. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) i w dochodzeniach epidemiologicznych (Helbin, Polakowska i Międzybrodzki., 2012; Pitt, 1988; Dera-Tomaszewska i Tokarska-Pietrzak, 2012).

Aby przeprowadzić typowanie bakteriofagowe, na półpłynne podłoże agarowe zawierające komórki badanego szczepu bakterii nakrapla się roztwór zawierający określoną liczbę cząstek bakteriofagów, a następnie pożywkę poddaje się inkubacji. Liza komórek bakteryjnych przez bakteriofagi widoczna jest w postaci tzw. łysinek, czyli przejaśnień w hodowli bakteryjnej w miejscu naniesienia zawiesiny bakteriofagów na agar. Obecność łysinki oznacza, że fag był swoisty dla badanego szczepu bakterii.

Typowanie bakteriofagowe, ze względu na dużą pracochłonność, koszty i stosunkowo niską powtarzalność wyników, zostało obecnie prawie zupełnie zastąpione przez doskonalsze i szybsze metody genetyczne.

Obecnie dużych szans dla bakteriofagów w rutynowej diagnostyce upatruje się w wykorzystaniu ich jako części składowej złożonych systemów sensorowych (jako tzw. biosensory, wykrywające obecność drobnoustrojów danego gatunku w badanej próbce, np. *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp., *Bacillus anthracis*, MRSA – ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Być może w przyszłości bakteriofagi posłużą także w terapii zakażeń z uwagi na rosnącą lekooporność patogenów. Wymaga to jednak dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych w celu oceny bezpieczeństwa i efektywności stosowania terapii fagowej (Baj i Markiewicz, 2015; El-Shibiny i El-Sahhar, 2017; Międzybrodzki i in., 2012).

## SPEKTROMETRIA MASOWA (ang. *mass spectrometry*, MS)

Spektrometria masowa jest jedną z najnowocześniejszych i coraz powszechniej stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej (szczególnie w bakteriologii i mykologii) metod identyfikacji drobnoustrojów. Identyfikacja ta opiera się na analizie białek (np. białek rybosomalnych) występujących u patogenu w dużych ilościach przy wykorzystaniu jonizacji próbki i pomiaru jej masy w spektrometrze masowym (Anhalt i Fenselau, 1975; Kim i in., 2020; van Belkum i in., 2017). Uzyskane rozkłady widm dla białek porównuje się z widmami odniesienia szczepów referencyjnych. Metoda pozwala uniknąć błędów podczas identyfikacji klasycznymi metodami, opierającymi się na ocenie cech biochemicznych izolatów. Jednocześnie możliwa jest analiza pokrewieństwa w obrębie izolatów tego samego gatunku. Przeprowadzenie identyfikacji wyhodowanych drobnoustrojów trwa kilka, kilkanaście minut dla pojedynczej próbki i ok. 1,5 godziny dla płytki z 96 próbkami.

Do przeprowadzenia identyfikacji wystarczający jest materiał zawierający  $10^5$  komórek bakteryjnych (tj. pojedynczą kolonię lub niewielką objętość hodowli płynnej). Pojawiły się także pierwsze testy umożliwiające identyfikację drobnoustrojów bezpośrednio w próbkach moczu i krwi, po ich preinkubacji. Wadą metody jest wysoki koszt urządzenia pomiarowego oraz brak możliwości oznaczenia wrażliwości na antybiotyki wyhodowanych drobnoustrojów (Tsuchida i in., 2020; Kaprou i in., 2021; Nordmann i Poirel, 2019; Biswas i Rolain, 2013).

## Bibliografia

- Abdelfattah M.M., Khattab R.A., Mahran M.H., Elborgy E.S. 2016. Evaluation of patients with dry eye disease for conjunctival *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. *International Journal of Ophthalmology* 9(10), str. 1457–1465. DOI: [10.18240/ijo.2016.10.15](https://doi.org/10.18240/ijo.2016.10.15).
- Alley T.L., Keller C.C., Moscatello K. 2016. *USMLE Step 1 Lecture Notes 2016: Immunology and Microbiology*, wyd. 1. Kaplan Medical, New York.
- Anhalt J.P., Fenselau C. 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 47(2), str. 219–225. DOI: [10.1021/ac60352a007](https://doi.org/10.1021/ac60352a007).
- Arastehfar A., Daneshnia F., Kord M., Roudbary M., Zarrinfar H., Fang W., Hashemi S.J., Najafzadeh M.J., Khodavaisy S., Pan W. 2019. Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA sequencing for a wide range of clinically isolated yeast species: improved identification by combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an alternative strategy for developing countries. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, nr art. 21. DOI: [10.3389/fcimb.2019.00021](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00021).
- Baj J. 2018. *Mikrobiologia*, wyd. 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Baj J., Markiewicz Z. 2015. *Biologia molekularna bakterii*, wyd. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Belkum A. van, Welker M., Pincus D., Charrier J.P., Girard V. 2017. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Annals of Laboratory Medicine* 37(6), str. 475–483. DOI: [10.3343/alm.2017.37.6.475](https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.475).
- Biswas S., Rolain J.M. 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of Microbiological Methods* 92(1), str. 14–24. DOI: [10.1016/j.mimet.2012.10.014](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.014).
- Boudjemaa R., Steenkeste K., Canette A., Briandet R., Fontaine-Aupart M.P., Marlière C. 2019. Direct observation of the cell-wall remodeling in adhering *Staphylococcus aureus* 27217: an AFM study supported by SEM and TEM. *Cell Surface* 5, nr art. 100018. DOI: [10.1016/j.tcs.2019.100018](https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100018).
- Bryniarski K. 2018. *Immunologia*, wyd. 1. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- Caliendo A.M., Gilbert D.N., Ginocchio C.C., Hanson K.E., May L., Quinn T.C., Tenover F.C., Alland D., Blaschke A.J., Bonomo R.A., Carroll K.C., Ferraro M.J., Hirschhorn L.R., Joseph W.S., Karchmer T., MacIntyre A.T., Reller L.B., Jackson A.F. 2013. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* 57(Suppl 3), str. S139–S170. DOI: [10.1093/cid/cit578](https://doi.org/10.1093/cid/cit578).
- Corrales I., Giménez E., Navarro D. 2014. Evaluation of the architect Epstein-Barr Virus (EBV) viral capsid antigen (VCA) IgG, VCA IgM, and EBV nuclear antigen 1 IgG chemiluminescent immunoassays for detection of EBV antibodies and categorization of EBV infection status using immunofluorescence assays as the reference method. *Clinical and Vaccine Immunology* 21(5), str. 684–688. DOI: [10.1128/CVI.00104-14](https://doi.org/10.1128/CVI.00104-14).



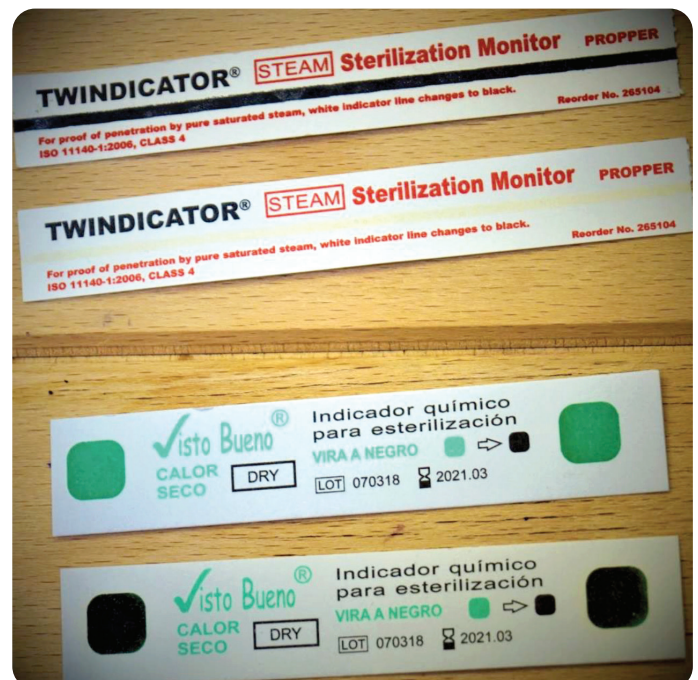
- Davis G.E., Parker R.R. 1938. A comparative study of two strains of rocky mountain spotted fever virus with special reference to the Weil-Felix reaction. United States Government Printing Office, Washington, str. 1523–1531.
- De Paschale M., Clerici P. 2012. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: problems and solutions. *World Journal of Virology* 1, str. 31–43.
- Dera-Tomaszewska B., Tokarska-Pietrzak E. 2012. Typowanie bakteriofagowe w diagnostyce pałeczek *Salmonella enteritidis* występujących w Polsce. *Postępy Mikrobiologii* 51(4), str. 323–329.
- Dixon P., Davies P., Hollingworth W., Stoddart M., MacGowan A. 2015. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 34(5), str. 863–876.  
DOI: [10.1007/s10096-015-2322-0](https://doi.org/10.1007/s10096-015-2322-0).
- Drewa G., Ferenc T. 2011. *Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów*, wyd. 1. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- Drobniewski F., Cooke M., Jordan J., Casali N., Mugwagwa T., Broda A., Townsend C., Sivaramakrishnan A., Green N., Jit M., Lipman M., Lord J., White P.J., Abubakar I. 2015. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technology Assessment* 19(34), str. 1–188. DOI: [10.3310/hta19340](https://doi.org/10.3310/hta19340).
- Efstratiou A., Engler K.H., Mazurova I.K., Glushkevich T., Vuopio-Varkila J., Popovic T. 2000. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *Journal of Infectious Diseases* 181(Suppl 1), str. S138–S145. DOI: [10.1086/315552](https://doi.org/10.1086/315552).
- El-Shibiny A., El-Sahhar S. 2017. Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 63(11), str. 865–879. DOI: [10.1139/cjm-2017-0030](https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0030).
- Essers L., Radebold K. 1980. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by a latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* 12(5), str. 641–643. DOI: [10.1128/jcm.12.5.641-643.1980](https://doi.org/10.1128/jcm.12.5.641-643.1980).
- Ferraro M.J., Kallas W.M., Welch K.P., Lau A.Y. 1987. Comparison of a new, rapid enzyme immunoassay with a latex agglutination test for qualitative detection of rubella antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 25(9), str. 1722–1724. DOI: [10.1128/jcm.25.9.1722-1724.1987](https://doi.org/10.1128/jcm.25.9.1722-1724.1987).
- Frickmann H., Zautner A.E., Moter A., Kikhney J., Hagen R.M., Stender H., Poppert S. 2017. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology* 43(3), str. 263–293. DOI: [10.3109/1040841X.2016.1169990](https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1169990).
- Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. 2017. *Immunologia*, wyd. 7. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Heikkilä R., Takala A., Käyhty H., Leinonen M. 1987. Latex agglutination test for screening of *Haemophilus influenzae* type b carriers. *Journal of Clinical Microbiology* 25(6), str. 1131–1133.  
DOI: [10.1128/jcm.25.6.1131-1133.1987](https://doi.org/10.1128/jcm.25.6.1131-1133.1987).
- Helbin W.M., Polakowska K., Międzobrodzki J. 2012. Czynniki wirulencji *Staphylococcus aureus* zależne od bakteriofagów. *Postępy Mikrobiologii* 51(4), str. 291–298.
- Huang W., Berube J., McNamara M., Saksena S., Hartman M., Arshad T., Bornheimer S.J., O’Gorman M. 2020. Lymphocyte subset counts in COVID-19 patients: a meta-analysis. *Cytometry A* 97(8), str. 772–776.  
DOI: [10.1002/cyto.a.24172](https://doi.org/10.1002/cyto.a.24172).
- Jaguś P., Chorostowska-Wynimko J., Roży A. 2010. Diagnostyka wybranych zakażeń wirusowych układu oddechowego. *Pneumonologia i Alergologia Polska* 78(1), str. 47–53.
- Kaprou G.D., Bergšpica I., Alexa E.A., Alvarez-Ordóñez A., Prieto M. 2021. Rapid methods for antimicrobial resistance diagnostics. *Antibiotics (Basel)* 10(2), nr art. 209. DOI: [10.3390/antibiotics10020209](https://doi.org/10.3390/antibiotics10020209).
- Killian M.L. 2020. Hemagglutination assay for influenza virus. *Methods in Molecular Biology* 2123, str. 3–10.  
DOI: [10.1007/978-1-0716-0346-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_1).
- Kim D., Ji S., Kim J.R., Kim M., Byun J.H., Yum J.H., Yong D., Lee K. 2020. Performance evaluation of a new matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, ASTA MicroIDSys system, in bacterial identification against clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 61, nr art. 102131.  
DOI: [10.1016/j.anaerobe.2019.102131](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102131).
- Kim K.W. 2016. High-resolution imaging of the microbial cell surface. *Journal of Microbiology* 54(11), str. 703–708. DOI: [10.1007/s12275-016-6348-5](https://doi.org/10.1007/s12275-016-6348-5).
- Kuchar E., Kacprzak-Bergman I. 2004. Zachorowanie na dur brzuszny 8-letniego chłopca. *Przegląd Epidemiologiczny* 58, str. 213–218.

- Kuklińska D., Chodorowska M. 2002. Nowelizacja laboratoryjnej diagnostyki błonicy. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* 54, str. 35–43.
- Kuyppers J., Jerome K.R. 2017. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 55(6), str. 1621–1628. DOI: [10.1128/JCM.00211-17](https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17).
- Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J., Shadomy H.J. 1985. *Manual of Clinical Microbiology*, wyd. 4. American Society for Microbiology, Washington.
- Levchik N., Ponomareva M., Surganova V., Zilberberg N. 2015. *Treponema pallidum* haemagglutination assay serum titres as a predictor of cerebrospinal fluid abnormalities in patients with syphilis. *Acta Dermatovenereologica* 95(7), str. 841–842. DOI: [10.2340/00015555-2077](https://doi.org/10.2340/00015555-2077).
- Levey B.A., Lo T.M., Caldwell K.E., Fletcher M.A. 1980. Latex test for serodiagnosis of infectious mononucleosis. *Journal of Clinical Microbiology* 11(3), str. 256–262. DOI: [10.1128/jcm.11.3.256-262.1980](https://doi.org/10.1128/jcm.11.3.256-262.1980).
- Luo C., Nobusawa E., Nakajima K. 1999. An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: the inhibitory effect of zanamivir on haemadsorption. *Journal of General Virology* 80(11), str. 2969–2976. DOI: [10.1099/0022-1317-80-11-2969](https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-2969).
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection* 10(3), str. 190–212. DOI: [10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x](https://doi.org/10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x).
- Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I. 2008. *Immunologia*, wyd. 2. Elsevier Urban & Partner, Wrocław.
- Międzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P., Kłak M., Wojtasik E., Górski A. 2012. Clinical aspects of phage therapy. *Advances in Virus Research* 83, str. 73–121. DOI: [10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7).
- Miller J.M., Binnicker M., Campbell S., Carroll K.C., Chapin K.C., Gilligan P.H., Gonzalez M.D., Jerris R.C., Kehl S.C., Patel R i in. 2018. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases* 67(6), str. e1–e94. DOI: [10.1093/cid/ciy381](https://doi.org/10.1093/cid/ciy381).
- Mizusawa M., Carroll K.C. 2020. Novel strategies for rapid identification and susceptibility testing of MRSA. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 18(8), str. 759–778. DOI: [10.1080/14787210.2020.1760842](https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1760842).
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller MA. 2016. *Mikrobiologia*, wyd. 8. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- Najważniejsze przesłania ogólne dla pracowników służby zdrowia w szpitalach i innych placówkach opieki zdrowotnej. 2021. Dostępne online: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Key-messages-HCP-PL.pdf> (dostęp: 15.09.2021).
- Nordmann P., Poirel L. 2019. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 69(Suppl 7), str. S521–S528. DOI: [10.1093/cid/ciz824](https://doi.org/10.1093/cid/ciz824).
- Park I.U., Tran A., Pereira L., Fakile Z. 2020. Sensitivity and specificity of treponemal-specific tests for the diagnosis of syphilis. *Clinical Infectious Diseases* 71(Suppl 1), str. S13–S20. DOI: [10.1093/cid/ciaa349](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa349).
- Parker N., Schneegurt M., Thi Tu A.H., Lister P., Forster B.M., Allen S., Auman A., Brelles-Mariño G., Feldman M.A., Flowers P., Pinchuk G., Rowley B., Sutherland M., Franklund C., Paterson A. 2016. *Microbiology*. Dostępne online: <https://openstax.org/books/microbiology/pages/2-3-instruments-of-microscopy> (dostęp: 15.09.2021).
- Paszkowski P., Noyce R.S., Evans D.H. 2016. Live-cell imaging of vaccinia virus recombination. *PLoS Pathogens* 12(8), nr art. e1005824. DOI: [10.1371/journal.ppat.1005824](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005824).
- Pegoraro M., Militello V., Salvagno G.L., Gaino S., Bassi A., Caloi C., Peretti A., Bizzego S., Poletto L., Bovo C., Lippi G., Lo Cascio G. 2020. Evaluation of three immunochromatographic tests in COVID-19 serologic diagnosis and their clinical usefulness. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 20, str. 1–4. DOI: [10.1007/s10096-020-04040-1](https://doi.org/10.1007/s10096-020-04040-1).
- Pitt T.L. 1988. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 7(2), str. 238–247. DOI: [10.1007/BF01963095](https://doi.org/10.1007/BF01963095).
- Prince H.E., Lapé-Nixon M. 2014. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clinical and Vaccine Immunology* 21(10), str. 1377–1384. DOI: [10.1128/CVI.00487-14](https://doi.org/10.1128/CVI.00487-14).
- Reta D.H., Tessema T.S., Ashenef A.S., Desta A.F., Labisso W.L., Gizaw S.T., Abay S.M., Melka D.S., Reta F.A. 2020. Molecular and immunological diagnostic techniques of medical viruses. *International Journal of Microbiology* 2020, nr art. 8832728. DOI: [10.1155/2020/8832728](https://doi.org/10.1155/2020/8832728).

- Riley L.W., Blanton R. 2018. Advances in molecular epidemiology of infectious diseases: definitions, approaches, and scope of the field. *Microbiology Spectrum* 6(6). DOI: [10.1128/microbiolspec.AME-0001-2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0001-2018).
- Robinson J.P. 2018. Overview of flow cytometry and microbiology. *Current Protocols in Cytometry* 84(1), nr art. e37. DOI: [10.1002/cpcy.37](https://doi.org/10.1002/cpcy.37).
- Safa A., Jime J.S., Shahel F. 2020. Cholera toxin phage: structural and functional diversity between *Vibrio cholerae* biotypes. *AIMS Microbiology* 6(2), str. 144–151. DOI: [10.3934/microbiol.2020009](https://doi.org/10.3934/microbiol.2020009).
- Saffert R.T., Cunningham S.A., Ihde S.M., Jobe K.E.M., Mandrekar J., Patel R. 2011. Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for identification of Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3), str. 887–892. DOI: [10.1128/JCM.01890-10](https://doi.org/10.1128/JCM.01890-10).
- Sguassero Y., Cuesta C.B., Roberts K.N., Hicks E., Comandé D., Ciapponi A., Sosa-Estani S. 2015. Course of chronic *Trypanosoma cruzi* infection after treatment based on parasitological and serological tests: a systematic review of follow-up studies. *PLoS One* 10(10), nr art. e0139363. DOI: [10.1371/journal.pone.0139363](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139363).
- Shojaeian S., Lay N.M., Zarnani A.H. 2018. Detection Systems in Immunohistochemistry. W: Streckfus C., *Immunohistochemistry – The Ageless Biotechnology*, DOI: [10.5772/intechopen.82072](https://doi.org/10.5772/intechopen.82072).
- Solaimalai D., Rathore S., Beck M.M., Regi A., Yesudhasan B.L., Veerarahavan B., Prakash J.A.J. 2020. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus Venereal Disease Research Laboratory test (VDRL) and rapid plasma reagin test (RPR) for screening of syphilis in pregnant women. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 150(1), str. 103–107. DOI: [10.1002/ijgo.13154](https://doi.org/10.1002/ijgo.13154).
- Szewczyk E.M. 2019. *Diagnostyka bakteriologiczna*, wyd. 3. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa.
- Thomas E.E., Roscoe D.L., Book L., Bone B., Browne L., Mah V. 1994. The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. *American Journal of Clinical Pathology* 101(6), str. 742–746. DOI: [10.1093/ajcp/101.6.742](https://doi.org/10.1093/ajcp/101.6.742).
- Tsuchida S., Umemura H., Nakayama T. 2020. Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules* 25(20), nr art. 4775. DOI: [10.3390/molecules25204775](https://doi.org/10.3390/molecules25204775).
- Welkos S.L., Holmes R.K. 1981. Regulation of toxinogenesis in *Corynebacterium diphtheriae*. I. Mutations in bacteriophage beta that alter the effects of iron on toxin production. *Journal of Virology* 37(3), str. 936–945. DOI: [10.1128/JVI.37.3.936-945.1981](https://doi.org/10.1128/JVI.37.3.936-945.1981).
- Wormser G.P., Stahl R.E., Bottone E.J. 1987. *AIDS, acquired immune deficiency syndrome and other manifestations of HIV infection*. Noyes Publications, New Jersey.
- Żeromski J., Madaliński K., Witkowski J.M. 2017. *Diagnostyka immunologiczna w praktyce lekarskiej*, wyd. 1. Mediton Oficyna Wydawnicza, Łódź.

# ROZDZIAŁ IV. METODY ZWALCZANIA DROBNOUSTROJÓW – DEZYNFEKCJA I STERYLIZACJA

CHAPTER IV.  
METHODS USED TO CONTROL MICROORGANISMS –  
DISINFECTION AND STERILIZATION



## Wprowadzenie

Środowisko szpitalne i warunki w nim panujące sprzyjają transmisji drobnoustrojów. W jednym miejscu, na ograniczonej przestrzeni, znajdują się podatni na zakażenie pacjenci oddziałów szpitalnych, poddawani często inwazyjnym zabiegom diagnostyczno-terapeutycznym, obsługiwani przez ten sam, zwykle niewielki zespół personelu medycznego. Zarówno ludzie obecni w środowisku szpitalnym – pacjenci, lekarze, pielęgniarki – jak i sprzęt medyczny oraz infrastruktura szpitala mogą stać się pierwszym ogniwem łańcucha epidemiologicznego, z którego możliwe jest przeniesienie drobnoustrojów na gospodarza podatnego na infekcję – innego pacjenta, lekarza, pielęgniarkę, a także rozprzestrzenienie się patogenu w otoczeniu. Kontrola wszystkich ogniw łańcucha epidemiologicznego, tj. źródeł, dróg transmisji i wrót infekcji, pozwala istotnie zmniejszyć ryzyko zakażeń związanych z opieką medyczną.

Podstawą zwalczania drobnoustrojów w środowisku szpitalnym jest wysoki poziom higieny. Proces prowadzący do usunięcia lub zniszczenia mikroorganizmów, skutkujący tym, że określone przedmioty i materiały stają się bezpieczne dla zdrowia, określa się mianem dekontaminacji, która obejmuje sanityzację, dezynfekcję i sterylizację (Heczko i in., 2015; Rutala i Weber, 2016).

Sanityzacja, czyli oczyszczanie, polega na usuwaniu widocznych zabrudzeń i zanieczyszczeń, a wraz z nimi także większości drobnoustrojów (np. poprzez mycie, odkurzanie, malowanie).

W wyniku dezynfekcji usunięciu lub zniszczeniu ulegają przede wszystkim formy wegetatywne drobnoustrojów (komórki bakterii, grzybów, pierwotniaków). W stanie nienaruszonym pozostaną endospory bakteryjne, zarodniki grzybów, niektóre wirusy (głównie bezosłonkowe). Pewne niesporujące bakterie, np. z rodzaju *Mycobacterium* (prątki), również mogą nie ulec inaktywacji.

Sterylizacja to proces prowadzący do zniszczenia, wyeliminowania wszystkich form drobnoustrojów.

Właściwy dobór metod dekontaminacji wpływa na zmniejszenie ryzyka transmisji patogenów w środowisku szpitalnym. Narzędzia chirurgiczne czy zestawy do iniekcji, mające bezpośredni kontakt z nieciągnątką tkanką skórną i błonami śluzowymi, wprowadzane do jałowych obszarów ciała pacjenta, w celu zminimalizowania ryzyka transmisji patogenów muszą zostać przed użyciem poddane procesowi sterylizacji. Jeśli przedmiot używany w szpitalu nie ma z chorym bezpośredniego kontaktu albo jest to kontakt ograniczony do zdrowej, ciągłej skóry, wystarczające będą odpowiednie metody sanityzacji lub dezynfekcji. W przypadku przedmiotów używanych do opieki nad pacjentem z upośledzoną sprawnością układu immunologicznego, gdzie w grę wchodzi kontakt z błonami śluzowymi chorego, należy wybrać odpowiednią spośród dostępnych metodę dezynfekcji lub sterylizacji. Uwzględnia się przy tym właściwości wybranego przedmiotu (np. czy jest wytrzymały na wysokie temperatury), stopień jego kontaminacji, a także cechy patogenów (np. czy są szczególnie wirulentne, czy łatwo przenoszą się w środowisku szpitalnym).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dzieli przedmioty znajdujące się w środowisku szpitalnym na trzy kategorie (Heczko i in., 2015; Guidelines, 2019). Do pierwszej zaliczono przedmioty istotnie zwiększające ryzyko transmisji infekcji (muszą one być jałowe, ponieważ mają bezpośredni kontakt z jałowymi tkankami, np. cewniki naczyniowe i moczowe, protezy wewnętrzne, igły, narzędzia chirurgiczne). Kategorią drugą objęto przedmioty zwiększające ryzyko transmisji infekcji w stopniu średnim (jeśli jest to technicznie możliwe, powinny być jałowe, np. elementy zestawu do intubacji, jak łyżka laryngoskopu, endoskop). Przedmioty mające znikomy wpływ na ryzyko transmisji zakażenia należą do kategorii trzeciej i nie muszą być jałowe, ponieważ mają bezpośredni kontakt z nieuszkodzoną skórą, powinny być jednak czyste (np. mankiet do ciśnieniomierza, elementy sprzętu do intubowania, jak rękojeść i prowadnica laryngoskopu).

W odniesieniu do tkanek ludzkich zamiast pojęć dezynfekcja i sterylizacja stosuje się terminy antyseptyka i aseptyka. Są to procesy mające na celu zabezpieczenie wrót infekcji (Guidelines, 2019). Mianem antyseptyki określa się dezynfekcję skóry i błon śluzowych, także uszkodzonych, z zastosowaniem preparatów chemicznych, które nie mają szkodliwego wpływu na ludzkie tkanki. Środki antyseptyczne to substancje służące zredukowaniu liczby drobnoustrojów na powierzchni

tkanek, cechują się bezpieczeństwem użycia i skutecznością przeciwdrobnoustrojową (nie mają właściwości sporobójczych). Natomiast aseptyka to taki sposób postępowania, by zapobiec potencjalnemu zakażeniu tkanek (np. pola operacyjnego podczas zabiegu) i skażeniu powierzchni jałowych.

W rozdziale omówiono najważniejsze metody dezynfekcji i sterylizacji.

## Dezynfekcja

Dezynfekcja, czyli odkażanie, to postępowanie mające na celu maksymalną redukcję liczby drobnoustrojów w odkażanym materiale. Zdezynfekowany materiał nie musi być jałowy. Dezynfekcja, w przeciwieństwie do antyseptyki, dotyczy przedmiotów i powierzchni użytkowych. Wyróżnia się trzy poziomy odkażania: dezynfekcję wysokiego stopnia, dezynfekcję średniego stopnia oraz dezynfekcję niskiego stopnia (Murray i in., 2016). Podział ten pozwala dobrać odpowiednią metodę dezynfekcji, uwzględniając wcześniej stopień kontaminacji przedmiotu poddawanego odkażaniu, charakterystykę obecnych na nim zanieczyszczeń mikrobiologicznych (patogenów), właściwości fizyko-chemiczne przedmiotu i jego przeznaczenie (Tabela 1).

**Tabela 1.** Rodzaje dezynfekcji.

Poziom dezynfekcji	Niskiego stopnia	Średniego stopnia	Wysokiego stopnia
<b>Spektrum aktywności środka do dezynfekcji</b>	Środek zdolny do redukcji form wegetatywnych grzybów i bakterii (z wyjątkiem <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) oraz wirusów ostonkowych.	Środek zdolny do redukcji form wegetatywnych bakterii (w tym <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) i grzybów, a także wirusów (z ostonką i bez).	Środek zdolny do redukcji form wegetatywnych bakterii (w tym <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) i grzybów, form przetrwalnych bakterii i grzybów (endospor i zarodników) – z wyjątkiem ich wysokiego miana, a także wirusów (z ostonką i bez).
<b>Przykłady środków do dezynfekcji</b>	Czwartorzędowe sole amoniowe.	Alkohole, jodofory, fenole.	Wilgotne ciepło, glutaraldehyd, stężony H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , kwas nadoctowy, związki chloru.
<b>Zastosowanie opisywanego poziomu dezynfekcji</b>	Dezynfekcja stetoskopów, elektrod do elektrokardiogramu, mankietów do ciśnieniomierzy.	Dezynfekcja narzędzi i instrumentów medycznych, które nie są skontaminowane wysoce opornymi drobnoustrojami lub formami przetrwalnymi (np. wzierniki waginalne, laryngoskopy).	Dezynfekcja instrumentów medycznych, które mogłyby zostać uszkodzone podczas autoklawowania.

W praktyce stosowane są następujące rodzaje dezynfekcji (Munakata i Kuo, 2016; Nosowska, 1999):

- termiczne (z wykorzystaniem wysokiej temperatury ciepła suchego i ciepła wilgotnego),
- termiczno-chemiczne (z zastosowaniem preparatów chemicznych o temp. 60°C),
- chemiczne (z użyciem środków dezynfekcyjnych o udowodnionej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w postaci roztworów, proszków, granulatów, par i aerozoli),
- fizyczne (z wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego, filtracji).

#### DEZYNFEKCJA TERMICZNA

Dezynfekcja termiczna znalazła zastosowanie w odkażaniu bielizny, naczyń i wyposażenia sanitariatów. Przebiega z wykorzystaniem gorącej wody o temp. minimum 93°C lub pary wodnej o temp. 105–110°C, przy zmniejszonym ciśnieniu 0,45–0,50 atm, w czasie minimum 5 minut (Nosowska, 1999).

Przykładem dezynfekcji termicznej jest dekoktacja, czyli gotowanie, kiedy to temperatura wody (przy normalnym ciśnieniu) osiąga 100°C. Tę metodę można stosować tylko do przedmiotów i materiałów ciepłostalnych. Dekoktację należy prowadzić przez co najmniej 5 minut (zwykle 15–20 minut) od chwili rozpoczęcia wrzenia wody. Aby proces był skuteczny, niezbędne jest pełne zanurzenie dezynfekowanych instrumentów w wodzie.

Dezynfekcję termiczną można przeprowadzić również w zmywarce do naczyń, pod warunkiem, że ma ona możliwość mycia wodą o temperaturze wyższej niż 70°C (proces powinien trwać co najmniej 30 minut).

Do metod dezynfekcji termicznej zalicza się również ekspozycję przedmiotów dezynfekowanych na działanie pary wodnej o wysokiej temperaturze. W tym celu stosuje się urządzenia zwane potocznie „wyparzacznymi” (ich producenci posługują się czasami określeniem „sterylizatory parowe”, wprowadzającym w błąd, ponieważ proces sterylizacji wymaga zastosowania pary wodnej o temperaturze minimum 121°C, w podwyższonym ciśnieniu, przez kilkanaście do kilkudziesięciu minut, a takich parametrów nie uzyskamy w opisywanych urządzeniach).

Szczególnym przykładem dezynfekcji termicznej jest pasteryzacja, pozwalająca na eliminowanie drobnoustrojów z płynów. Proces polega na ogrzewaniu cieczy do temp. 65°C przez 30 minut (jeśli 75°C – to 10 minut), a następnie pozostawieniu jej do wystygnięcia w temperaturze pokojowej. Pasteryzacja znalazła zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym (np. w wyniku pasteryzacji mleka giną m.in. chorobotwórcze bakterie z rodzajów *Brucella*, *Salmonella*, *Mycobacterium*). Pasteryzacja mleka z wykorzystaniem temperatury wyższej niż 65–70°C (ang. *ultra high temperature*, UHT) charakteryzuje się następującymi parametrami: 135°C w czasie 2–9 sekund (lub 140°C przez 2–3 sekundy), pod normalnym ciśnieniem.

Przykładem użycia ciepła suchego w dezynfekcji termicznej może być prasowanie tkanin gorącym żelazkiem (także maglowanie bielizny) oraz opalanie drobnych narzędzi nad palnikiem Bunsena, np. ezy czy skalpela (parametry fizyczne wymienionych tu procesów nie mogą być w odpowiedni sposób kontrolowane, dlatego są one zaliczane do metod dezynfekcji, a nie sterylizacji).

#### DEZYNFEKCJA TERMICZNO-CHEMICZNA

Dezynfekcja termiczno-chemiczna jest używana do odkażenia sprzętu wrażliwego na działanie zbyt wysokich temperatur (Nosowska, 1999). Łączy przeciwdrobnoustrojową aktywność środków chemicznych z aktywnością temperatury, podniesionej do 60°C. Proces dezynfekcji termiczno-chemicznej powinien trwać 10 minut. Stosuje się niskie stężenia środków chemicznych, bo ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wzmacnia podwyższona temperatura roztworu.

## DEZYNFEKCJA CHEMICZNA

Dezynfekcja chemiczna jest to odkażanie przy użyciu roztworów preparatów chemicznych, zawierających substancje aktywne o udokumentowanych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (Heczko i in., 2015; Murray i in., 2016).

Preparat chemiczny należy dobrać odpowiednio do potrzeb, w zależności od tego, czy skład jakościowo-ilościowy kontaminacji pozostaje nieznan, czy też spodziewamy się określonej kompozycji mikrobiologicznej tego zanieczyszczenia. Należy też uwzględnić właściwości odkażanych przedmiotów (aby stosowany preparat pozostał bez wpływu na ich jakość) i – jak zawsze – skutki toksykologiczne użycia danego środka chemicznego. Niektóre chemiczne środki dezynfekcyjne mają właściwości sporobójcze (Tabela 1). Nie możemy jednak w stosunku do efektu ich działania użyć pojęcia sterylizacji, gdyż opisywany proces nie spełnia wymagań monitorowania wskaźnikami chemicznymi i biologicznymi. Ponadto przedmiot po dezynfekcji chemicznej, poddany płukaniu, obciążony jest ryzykiem wtórnej kontaminacji.

Związki chemiczne używane do dezynfekcji i antyseptyki zostaną omówione w dalszej części rozdziału.

## PROMIENIOWANIE ULTRAFIOLETOWE

Promieniowanie UV (ang. *ultra violet*) stosuje się w celu eliminacji mikroorganizmów z powietrza i powierzchni użytkowych. Bójczą skuteczność przeciwdrobnoustrojową wykazuje promieniowanie o długości fali 250–265 nm. UV niekorzystnie oddziałuje na materiał genetyczny mikroorganizmów i powoduje tworzenie się dimerów zasad purynowych i pirymidynowych (najczęściej dimerów tyminy) i inaktywuje tym samym patogeny.

Promieniowanie UV nie penetruje w głąb przedmiotu ekspozowanego. Obecność kurzu lub materii organicznej obniża skuteczność UV (konieczna jest uprzednia sanityzacja). Niektóre bakterie dysponują mechanizmami naprawy uszkodzeń DNA spowodowanych przez UV, niemniej promieniowanie to istotnie zmniejsza poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza i powierzchni użytkowych (błatów, podłóg), dlatego lampy UV znajdują się w każdym laboratorium mikrobiologicznym i wielu pomieszczeniach szpitalnych (sale operacyjne, zabiegowe, sterylizatornia) (Weber i in., 2016).

## FILTRACJA

Filtrację stosuje się do mechanicznego usuwania (wyłapywania) bakterii i grzybów z powietrza lub płynów ciepłowrażliwych (Nosowska, 1999).

Filtrów różnego rodzaju (np. porcelanowych Chamberlanda, z ziemi okrzemkowej Berkefelda, azbestowych lub ze spiekanego szkła) używa się do sączenia płynów ciepłowrażliwych, np. preparatów z białkiem lub antybiotykami. Ich wadą jest przepuszczalność dla cząstek wirusów i komórek mykoplazm, czyli bakterii pozbawionych ściany komórkowej. W wyżej wymienionych filtrach średnica por wynosi 0,2  $\mu\text{m}$ .

Filtry membranowe, wykonane z mieszaniny estrów celulozy, teflonu, nylonu i poliestru, zatrzymują także wirusy i mykoplazmy (średnica por wynosi mniej niż 0,1  $\mu\text{m}$ ).

Filtrów poliwęglanowych używa się w skaningowym mikroskopie elektronowym.

W salach operacyjnych i salach przeznaczonych dla pacjentów chorych na gruźlicę i AIDS (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*) do filtrowania powietrza stosuje się filtry HEPA (ang. *high efficiency particulate airfilters*).



## Związki chemiczne używane do dezynfekcji i antyseptyki

Preparaty dezynfekcyjne podlegają regulacjom prawnym (Ustawa z dnia 10 października 1991 r.) i opiniowaniu przez Państwowy Zakład Higieny, na który nałożono obowiązek okresowej publikacji listy pozytywnie zaopiniowanych preparatów chemicznych przeznaczonych do stosowania w zakładach opieki zdrowotnej. Kontrola skuteczności chemicznych środków dezynfekcyjnych jest możliwa pośrednio, na podstawie jakościowych i ilościowych badań mikrobiologicznej czystości powierzchni.

Na skuteczność dezynfekcji chemicznej mają wpływ następujące czynniki (Nosowska, 1999):

- temperatura (im wyższa temperatura środka dezynfekującego, tym wyższa skuteczność procesu),
- wilgotność (im wyższa wilgotność, tym wyższa skuteczność procesu),
- czas ekspozycji (im dłuższy, tym wyższa skuteczność procesu),
- stężenie preparatu dezynfekcyjnego (zwykle im wyższe, tym wyższa skuteczność procesu),
- pH środowiska (podwyższone pH obniża np. aktywność fenoli, podchlorynów i związków jodu, ale zwiększa aktywność czwartorzędowych związków amoniowych),
- obecność substancji organicznych (ogranicza aktywność przeciwdrobnoustrojową preparatów dezynfekujących poprzez neutralizację ich substancji czynnych).

Nie można dopuścić do zaschnięcia substancji organicznej na powierzchni narzędzi – jeżeli czyszczenie narzędzi ma nastąpić w późniejszym czasie, należy je przechowywać w roztworach myjąco-dezynfekujących, zabezpieczających przed zasychaniem zanieczyszczeń i jednocześnie inaktywujących drobnoustroje; takie roztwory robocze należy wymieniać przynajmniej raz dziennie.

Idealny preparat dezynfekcyjny powinien być tani, aktywny natychmiast po jego zastosowaniu, przy niskim stężeniu substancji czynnej, charakteryzować się szerokim spektrum aktywności (jeden preparat o właściwościach bakterio-bójczych, w tym – prątkobójczych, grzybobójczych, sporobójczych, inaktywujący również wirusy), nie indukować oporności wśród mikroorganizmów. Zarówno koncentrat substancji aktywnej (najlepiej dobrze rozpuszczalnej w wodzie, bez względu na jej twardość i obecność substancji organicznych), jak i roztwór użytkowy powinny być trwałe, ale też łatwo ulegające biodegradacji. Idealny środek dezynfekcyjny nie może być toksyczny dla ludzi i środowiska, drażniący, nie powinien posiadać zapachu i barwy oraz wykazywać działania korodującego (Zych i in., 2013).

Wśród używanych do dezynfekcji i antyseptyki związków chemicznych należy wymienić: fenole, czwartorzędowe sole amoniowe, alkohole, związki utleniające, halogenki, związki zawierające aktywny chlor, kwasy i zasady, metale ciężkie, barwniki. Do celów dezynfekcji sięga się także po nanotechnologię.

### ZWIĄZKI FENOLOWE

Są to związki organiczne niejonowe, np. lizol (roztwór krezolu w mydle potasowym), bisfenol (dimer fenolu), heksachlorofen (bisfenol poddany halogenacji, bardziej skuteczny od bisfenolu).

Charakteryzują się dobrą aktywnością grzybobójczą i bakterio-bójczą (ale nie sporobójczą) oraz słabym działaniem przeciwwirusowym (nie inaktywują enterowirusów). Fenol rozrywa bogate w lipidy struktury komórek drobnoustrojów, dlatego też pochodne fenolowe wykazują dobrą skuteczność wobec prątków, często opornych na inne związki dezynfekcyjne. Heksachlorofen to antyseptyk, aktywny w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, stosowany m.in. do eradykacji MRSA ze skóry skolonizowanych pacjentów (Murray i in., 2016).

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa związków fenolowych maleje w obecności substancji organicznych oraz w pH zasadowym. Wprowadzenie grup aromatycznych lub alifatycznych do fenoli halogenkowych podwyższa natomiast ich skuteczność przeciwdrobnoustrojową.

Pochodne fenolu mają drażniący wpływ na tkanki, niekorzystnie oddziałują na komórki nerwowe, posiadają drażniący zapach. Obecnie są rzadko używane do dezynfekcji (np. do odkażania metalowych części łóżek i szafek), ale nadal stosuje się je jako standard porównawczy do pomiaru aktywności przeciwdrobnoustrojowej innych środków dezynfekcyjnych.

## CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE

Czwartorzędowe związki amoniowe (ang. *quaternary ammonium compounds*, QAC) są jonowymi, powierzchniowo czynnymi związkami organicznymi. Odznaczają się wyjątkową, hydrofilowo-hydrofobową budową cząsteczki chemicznej (stąd doskonale rozpuszczają się w substancjach polarnych i niepolarnych, z łatwością przenikają przez błony cytoplazmatyczne). Część organiczna molekuly posiada ładunek dodatni. QAC występują pod postacią soli (ang. *quaternary ammonium salts*, QAS) i wodorotlenków (Lipińska-Ojrzanowska i Walusiak-Skorupa, 2014; Teper i Stachurek, 2016).

QAS są powszechnie wykorzystywane jako środki do dezynfekcji. Dodaje się je do preparatów używanych do odkażania nieuszkodzonej skóry i błon śluzowych, dekontaminacji powierzchni użytkowych i instrumentów medycznych. Ponieważ są związkami powierzchniowo czynnymi, stanowią dodatek do środków piorących. Używa się ich również do produkcji polimerów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

QAS wykazują aktywność wobec bakterii, których komórki mają ujemny ładunek. Wnikają do ich wnętrza, uszkodzają błonę cytoplazmatyczną i przyczyniają się do rozpadu komórek prokariotów. Mają też aktywność przeciwprętową i (w ograniczonym stopniu) przeciwwirusową. W niższych stężeniach działają biostatycznie, w wyższych – grzybobójczo i bakteriobójczo (*Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. i *Trichophyton* spp. pozostają niewrażliwe). Nie inaktywują form przetrwalnych bakterii i grzybów oraz wirusów nagich (niszczą wirusy ostonkowe).

Przykładem QAS są: chlorek benzalkoniowy, bromek alkilodimetylobenzyloamoniowy, bromek laurylopirydyniowy, bromek benzylodecyloamoniowy, chlorek cetylopirydyniowy.

## ALKOHOLE

Są to rozpuszczalniki organiczne niejonowe, np. metanol, etanol, izopropanol, niezastąpione w antyseptyce (zwłaszcza etanol i izopropanol) i dezynfekcji (np. do dekontaminacji stetoskopów, termometrów, gumowych korków).

Etanol i izopropanol działają szybko na wegetatywne postaci bakterii, wirusy ostonkowe (np. wirusy grypy, herpeswirusy) i nagie (np. adenowirusy, rotawirusy). Nie inaktywują endospor. Są słabo skuteczne wobec wielu rodzajów grzybów i wirusów nagich, jak poliovirus i wirus zapalenia wątroby typu A, należących do rodziny *Picornaviridae* (Heczko i in., 2015; Murray i in., 2016). Roztwory alkoholowe, będące mieszaniną etanolu i propanolu (również z dodatkiem innych substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, np. chlorku didecyloamoniowego), wykazują aktywność przeciwprętową.

Uszkodzają błonę cytoplazmatyczną komórki bakteryjnej (dochodzi do zmiany jej przepuszczalności) i ścianę komórkową. Zaburzeniu ulegają procesy metaboliczne, głównie poprzez denaturację białek.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa alkoholi rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha cząsteczki chemicznej, a także w wodzie (70-procentowy roztwór wodny alkoholu jest bardziej skuteczny niż roztwór 95-procentowy), jednak nadmiernie rozcieńczony alkohol (poniżej 50%) traci aktywność przeciwdrobnoustrojową. Skuteczność roztworu alkoholu wzrasta, jeśli po jego użyciu skórę przemyje się dodatkowo związkiem jodoformowym. Dezynfekcja z użyciem preparatu na bazie alkoholu powinna dotyczyć powierzchni czystych, poddanych wcześniej sanitzacji (obecność materii organicznej obniży jej skuteczność).

## ZWIĄZKI UTLENIAJĄCE

Oksydanty (związki nadtlenowe) to np.  $H_2O_2$ , kwas nadoctowy, nadboran sodu, nadsiarczan potasu. Mają szerokie spektrum działania – wykazują aktywność wobec bakterii, w tym prątków, a także wobec wirusów i grzybów (Rutala i Weber, 2019).

$H_2O_2$  jest stosowany w antyseptyce (3-procentowy roztwór  $H_2O_2$  to woda utleniona, związek bezpieczny w użyciu, bez właściwości drażniących). W stężeniach 3–6% zabija większość bakterii, natomiast w stężeniach wyższych (10–25%) inaktywuje wszystkie drobnoustroje, także formy przetrwalne (przy czasie ekspozycji wydłużonym nawet do godziny). Jest używany do dezynfekcji implantów, soczewek kontaktowych, protez chirurgicznych. Aktywną formą  $H_2O_2$  jest powstający wskutek jego rozkładu tlen rodnikowy, oddziałujący niekorzystnie na białka i kwasy nukleinowe mikroorganizmów (bakterie wydzielające katalazę neutralizują tlen rodnikowy).

Kwas nadoctowy jest używany do dezynfekcji (wysokiego stopnia) i sterylizacji. Wykazuje aktywność wobec wegetatywnych form grzybów i bakterii, w tym prątków, a także endospor bakteryjnych (przy wydłużonym czasie ekspozycji) i enterowirusów. Zachowuje skuteczność przeciwdrobnoustrojową mimo obecności zanieczyszczeń organicznych. Może powodować korozję metali. Jest bezpieczny dla środowiska – ulega rozpadowi do tlenu i kwasu octowego. Roztwory o stężeniu wyższym niż 5% mogą powodować oparzenia.

Nadboran sodu i nadsiarczan potasu znalazły zastosowanie w dezynfekcji narzędzi (mają zakres działania podobny do preparatów chlorowych, zastępują je ze względów ekologicznych).

## HALOGENKI

Są to związki zawierające jod lub chlor, używane powszechnie jako środki dezynfekcyjne. Najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową posiadają związki jodu, ponieważ jod jest wysoce reaktywnym pierwiastkiem, strącającym białka i utleniającym enzymy mikroorganizmów. Związki jodu wykazują aktywność wobec wszystkich drobnoustrojów, w tym prątków i bakterii sporujących.

Jod pierwiastkowy, rozpuszczony w wodnym roztworze jodku potasu, to płyn Lugola, natomiast rozpuszczony w alkoholu to jodyna. Jod pierwiastkowy może też być związany z nośnikiem – tego rodzaju związek chemiczny nazywa się jodoforem (np. powidon – jod stosowany do dezynfekcji i antyseptyki, związany z poliwinylpropionem, bezpieczny dla tkanek, nie uszkadzający powierzchni metalowych, ale drogi w porównaniu z innymi związkami jodu; powidon ma ograniczoną aktywność w stosunku do prątków i przetrwalników).

Chlor zawierają następujące antyseptyki: chlorheksydyna, triclosan, chloroksylenol. Są używane do dezynfekcji, a także do odkażania skóry rąk, pola operacyjnego, ran i płukania jamy ustnej, dodaje się je także do mydeł i past do zębów. Spośród wyżej wymienionych najszersze spektrum aktywności ma chlorheksydyna. Żaden z tych antyseptyków nie ma jednak właściwości sporobójczych (Rutala i Weber, 2019).

## PREPARATY ZAWIERAJĄCE AKTYWNY CHLOR

Chloramina, podchloryn sodu, podchloryn wapnia używane są do dezynfekcji instalacji wodnej i pościeli szpitalnej. Zaburzają metabolizm komórkowy bakterii (także prątków) i grzybów, hamują syntezę białek, uszkadzają materiał genetyczny drobnoustrojów (w tym wirusów). Są związkami nietrwałymi, ulegają inaktywacji pod wpływem światła, ciepła i wilgoci. Obecność substancji organicznych w środowisku obniża ich skuteczność. W kwaśnym pH gwałtownie uwalniany jest chlor, w szkodliwym dla zdrowia stężeniu (działanie drażniące na drogi oddechowe, skórę, oczy) (Murray i in., 2016).

## POZOSTAŁE

Kwasy i zasady, ze względu na nieneutralne wartości pH, denaturują białka mikroorganizmów (zmieniają strukturę protein). Stosowane są głównie do konserwacji żywności, np. kwas benzoesowy, kwas salicylowy, kwas mlekowy.

Metale ciężkie (rtęć, srebro, arsen) wiążą się z grupami sulfhydrylowymi białek i inaktywują ich aktywność enzymatyczną. Preparaty zawierające metale ciężkie, ze względu na toksyczność, są w antyseptyce stosowane wyłącznie miejscowo (np. azotan srebra).

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazują barwniki (np. używany do barwienia metodą Grama fiolet krystaliczny czy gencjana będąca antyseptykiem) i mleczan etakrydyny (Rivanol, antyseptyk) (Kutrowska, 2006).

## NANOTECHNOLOGIA

Nanocząsteczki to cząsteczki, których wielkość nie przekracza 100 nm. Skuteczność przeciwdrobnoustrojową wykazują nanocząsteczki srebra. Pierwiastek ten niszczy komórki bakterii i grzybów w reakcji z ich powłokami poprzez utlenianie i denaturację składników chemicznych, a także niekorzystny wpływ na DNA mikroorganizmów.

Bakterie nie rozwijają oporności na srebro, jak to ma miejsce w przypadku antybiotyków (Shahverdi i in., 2007). Środki do dezynfekcji zawierające nanocząsteczki srebra mogą stanowić uzupełnienie dostępnych metod dezynfekcji szpitalnych powierzchni użytkowych, blatów mebli, łóżek czy parapetów przez pokrywanie ich farbą lub spryskiwanie powłoką z nanocząsteczkami srebra. Również tkaniny zaimpregnowane taką powłoką posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe (obserwuje się jednak powolne wyłukiwanie molekuł srebra w czasie prania).

## HIGIENA RĄK W WARUNKACH SZPITALNYCH

Jednym z najprostszych, a zarazem najważniejszych sposobów zapobiegania transmisji zakażeń w placówkach opieki medycznej i poza nimi jest właściwa higiena rąk (Heczko i Wójkowska-Mach, 2009; Pittet i in., 2009; WHO, 2009).

Zwykłe mycie rąk stosuje się, gdy ręce są widocznie brudne lub zanieczyszczone płynami ustrojowymi lub gdy na oddziale szpitalnym odnotowano zakażenia bakteriami sporującymi. Należy używać mydła zwykłego lub antybakteryjnego (antyseptyki z alkoholem nie usuną ani zabrudzeń ani endospor).

Higieniczne mycie rąk stosuje się przed kontaktem z pacjentem i po nim, gdy u tej samej osoby zmieniamy obszar pielęgnacji ciała ze skażonego na inny, przed kontaktem z inwazyjnym instrumentem medycznym, który ma być zastosowany u pacjenta, po kontakcie z powierzchnią z otoczenia pacjenta, po kontakcie z wydzielinami, wydaliniami i płynami ustrojowymi pacjenta, przed przygotowaniem leków dla chorych oraz po zdjęciu rękawiczek jałowych lub niejałowych (należy użyć antyseptyku na bazie alkoholu).

Chirurgiczne mycie rąk jest wymagane przed przystąpieniem do wykonywania procedury w warunkach aseptycznych (używamy antyseptyków na bazie alkoholu, w tym antyseptyków o przedłużonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, np. chlorheksydyny).

## Sterylizacja

Sterylizacja (wyjaławianie) polega na eliminacji wszystkich form i rodzajów drobnoustrojów z określonego materiału, przedmiotu. Procesowi są poddawane instrumenty medyczne wchodzące w bezpośredni kontakt z jałowymi tkankami, jak również podłoża do diagnostyki mikrobiologicznej.

Oczekiwany efekt wyjąławiania – produkt sterylny (jałowy, pozbawiony wszelkich mikroorganizmów) – uzyskiwany jest w wyniku:

- prawidłowego przygotowania materiałów do sterylizacji,
- doboru odpowiednich metod sterylizacji,
- niezakłóconego przebiegu procesu sterylizacji,
- właściwego przechowywania i używania przedmiotów po sterylizacji.

Materiał przeznaczony do sterylizacji musi być odpowiednio przygotowany. Instrumenty medyczne poddaje się dezynfekcji wstępnej. Są myte pod bieżącą wodą o jakości wody pitnej lub w myjniach automatycznych (ich powierzchnie należy dokładnie oczyścić z substancji organicznych), następnie suszone, przeglądane, konserwowane, pakowane (we włókniny, rękawy papierowo-foliowe i papierowe, torby – opakowanie musi być przepuszczalne dla czynników sterylizujących), opisywane (na opakowaniu powinna znaleźć się data sterylizacji lub data przydatności do użycia produktu sterylnego oraz informacja na temat rodzaju zawartości – w przypadku opakowań nieprzezroczystych) (Nosowska, 1999).

Należy przestrzegać zasad prawidłowego doboru metod sterylizacji i jednocześnie uwzględnić charakterystykę drobnoustrojów oraz właściwości czynnika sterylizującego i przedmiotu sterylizowanego. Czynniki wyjąławiające wpływają destrukcyjnie na mikroorganizmy poprzez zjawiska koagulacji, denaturacji i utleniania. Aby działał skutecznie, parametry sterylizacji, do których należą m.in. temperatura, czas, wilgotność, natężenie (w przypadku promieniowania), stężenie (w przypadku związku chemicznego), muszą być ściśle kontrolowane. Czynniki sterylizujące (czy to fizyczny, czy chemiczny) powinny być bezpieczne dla ludzi, środowiska i materiału poddawanego sterylizacji (proces nie może uszkadzać lub zmieniać jego właściwości). Istotna jest dobra penetracja czynnika wyjąławiającego, co może być bardzo utrudnione np. w przypadku instrumentów o długich i wąskich kanałach. Ze względów ekonomicznych liczą się jak najkrótszy czas sterylizacji oraz niezawodność, przystępna cena i niskie koszty eksploatacji urządzenia sterylizującego (Nosowska, 1999).

W praktyce stosowane są następujące rodzaje wyjąławiania: sterylizacja wysokotemperaturowa i sterylizacja niskotemperaturowa.

#### STERYLIZACJA WYSOKOTEMPERATUROWA

Do metod sterylizacji wysokotemperaturowej należą: autoklawowanie, tyndalizacja i wyjąławianie suchym gorącym powietrzem.

Autoklawowanie to sterylizacja parą wodną w nadciśnieniu, prowadzona przez ściśle określony czas (Ling i in., 2018; Rutala i Weber, 2013). Wykorzystuje nasyconą parę wodną w nadciśnieniu o wartości 1 atm (w temp. 121°C przez 15–20 minut) lub 2 atm (w temp. 134°C przez 3–5 minut). Jest to metoda właściwa do sterylizacji materiałów ciepłostalnych, obojętnych na działanie fizycznych czynników wyjąławiających wymienionych wyżej. Proces odbywa się w autoklawach przepływowych (gdzie powietrze wypierane jest z komory sterylizatora parą wodną) lub próżniowych (gdzie wstępnym etapem procesu jest wytworzenie próżni w komorze sterylizatora). Para wodna ma dobre właściwości penetrujące, w krótkim czasie niszczy drobnoustroje i powoduje koagulację ich białek. Metodę stosuje się np. do sterylizacji instrumentów medycznych i pożywek mikrobiologicznych. Autoklaw to podstawowe wyposażenie każdej sterylizatorni.

Tyndalizacja to sterylizacja z wykorzystaniem bieżącej pary wodnej, przeprowadzana w aparacie Kocha. Materiał wyjąławiany poddaje się trzykrotnemu działaniu pary wodnej przez 20–30 minut, w odstępach 24-godzinnych. Po każdym ogrzaniu jest on pozostawiany do wystygnięcia w temperaturze pokojowej. Temperatura pary wodnej (ok. 100°C) niszczy formy wegetatywne drobnoustrojów. Formy przetrwalne, obecne w materiale poddawanym temu procesowi sterylizacji, w temperaturze pokojowej przeistaczają się w formy wegetatywne, które są niszczone w kolejnym cyklu podgrzania. Trzecie ogrzanie materiału kończy proces tyndalizacji. Metoda bywa stosowana do wyjąławiania płynów, w tym płynnych podłoży mikrobiologicznych, a także maści i kremów zawierających substancje wrażliwe na działanie wysokiej temperatury. Tyndalizację wykorzystywano powszechnie, zanim w laboratoriach i szpitalach pojawiły się autoklawy (Heczko i in., 2015).

Sterylizacja suchym, gorącym powietrzem odbywa się w aparatach z wymuszonym obiegiem powietrza (w temp. 160°C przez 60 minut lub w temp. 180°C przez 45 minut) lub w aparatach z naturalnym obiegiem powietrza (w temp. 160°C przez 150 minut lub w temp. 180°C przez 60 minut). Metoda obarczona jest istotnymi wadami, do których należą: zła penetracja suchego powietrza, konieczność uzyskiwania wysokich temperatur, czasochłonność. Ponadto wewnątrz komory sterylizacyjnej istnieją różnice temperatur (dopuszczalne do 15°C), co wiąże się z ryzykiem błędu sterylizacji. Metoda wykorzystywana do wyjaławiania przedmiotów szklanych, maści, pudrów i substancji oleistych (Ling i in., 2018; Rutala i Weber, 2013).

#### STERYLIZACJA NISKOTEMPERATUROWA

Jest to inaczej zimna sterylizacja, odpowiednia do wyjaławiania przedmiotów i materiałów ciepłowrażliwych (Heczko i in., 2015; Nosowska, 1999).

Steryлизację tlenkiem etylenu, bezbarwnym, rozpuszczalnym w wodzie gazem, prowadzi się zwykle przez 2–4 godziny w temp. 30–65°C i w środowisku o 30–90% wilgotności. Czas trwania degazacji, czyli procesu wietrzenia (koniecznego ze względu na to, że omawiany gaz ma właściwości rakotwórcze, jest łatwopalny i wybuchowy), wskazywany jest przez producenta urządzenia do wyjaławiania i najczęściej wynosi 12 godzin w temp. 50°C (w tzw. aeratorze) lub 7 dni w temp. pokojowej. Tlenek etylenu inaktywuje nie tylko roślinne postaci drobnoustrojów, ale także ich formy przetrwalne – alkiluje terminalne reszty hydroksylowe, karboksylowe i aminowe, przez co blokuje reaktywne grupy chemiczne ważnych procesów metabolicznych.

Wyjaławianie kwasem nadoctowym w formie gazowej prowadzi się przez 30 minut w temp. 50–55°C. Uwagę zwraca wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa oparów kwasu nadoctowego. Sam związek jest jednak nietrwały, produkty jego rozpadu – tlen i kwas octowy – nie są toksyczne dla człowieka i środowiska.

Sterylizacja oparami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wymaga użycia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w stężeniu 10–25%. Proces odbywa się w temp. 40–60°C, trwa 90 minut. Metodę wykorzystuje się do sterylizacji instrumentów i narzędzi medycznych.

Możliwe jest również wyjaławianie plazmą H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Stężenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wynosi w tym przypadku od 50% do 55%, reakcja zachodzi w temp. 40–60°C w czasie 45–75 minut. Stan plazmowy uzyskuje się poprzez przeprowadzenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w formę gazu, a następnie bombardowanie jego cząsteczek wysoką energią. Generuje to powstawanie wolnych rodników tlenowych – otrzymujemy wysoce zjonizowany gaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Sterylizacja ozonem prowadzona jest przez 30–120 minut w temp. 25°C i przy wilgotności w zakresie 75–95%. Ozonu używa się m.in. do dezynfekcji wody.

Zimna sterylizacja to także wyjaławianie przy użyciu promieniowania jonizującego. Jego źródłem są akceleratory elektronów lub izotopy kobaltu. Promieniowanie niszczy integralność osłon komórkowych mikroorganizmów i jest bezpośrednią przyczyną pęknięcia łańcucha DNA. Metodę stosuje się np. do przemysłowej sterylizacji implantów i opatrunków.

Prowadzenie sterylizacji formaldehydem wymaga zadbania o odpowiednie stężenie tego związku chemicznego (2–5%), właściwą wilgotność środowiska reakcji (ponad 70%) i temperaturę (48–75°C). Proces trwa nawet 6 godzin. Aldehyd mrówkowy (formaldehyd) i aldehyd glutarowy są związkami alkilującymi, denaturującymi białka i kwasy nukleinowe mikroorganizmów. Uszkadzają również błonę cytoplazmatyczną. Aldehydy charakteryzują się szerokim spektrum działania, obejmującym prokarioty (w tym prątki gruźlicy), wirusy, grzyby i formy przetrwalne drobnoustrojów.

Ekspozycja skóry i błon śluzowych na działanie formaldehydu jest niedopuszczalna ze względu na toksyczne i rakotwórcze właściwości związku. Mniej toksyczny wobec żywej tkanki jest aldehyd glutarowy, jednak i on może doprowadzić do oparzeń skóry i błon śluzowych.

Aldehydy są stosowane do wyjaławiania drobnego sprzętu medycznego, instrumentów medycznych. Formaldehyd stosuje się np. do sterylizacji filtrów HEPA.

Wadą tego typu sterylizacji jest długi czas zanurzenia narzędzi w roztworze, a także konieczność wypłukiwania przedmiotów jałowionych. Czas zanurzenia jest często skracany do kilkudziesięciu minut, przez co proces sterylizacji przekształca się w dezynfekcję. Wyjaławianie aldehydami

oceniono jako szkodliwe dla środowiska w stopniu wysokim. Do przeprowadzenia procesu potrzebne jest pomieszczenie wyposażone w wydajną wentylację. Aldehydy nie powinny być stosowane do dezynfekcji dużych powierzchni użytkowych.

#### ULTRADŹWIĘKI

Zastosowanie w procesie sterylizacji znalazły też ultradźwięki. Wykorzystuje się fale ultradźwiękowe o częstotliwości powyżej 20 kHz, wytwarzane w sonikatorach, w których wykorzystywane jest zjawisko kawitacji, polegające na wytworzeniu w roztworze olbrzymiej ilości fal ciśnieniowych, wywołanych przez implodujące pęcherzyki powietrza, rozrywające komórki drobnoustrojów. Ultradźwięki silnie oddziałują na żywe bakterie, zwłaszcza komórki pochodzące z młodych hodowli. Z uwagi na różnice w budowie ściany komórkowej, bardziej podatne na działanie ultradźwięków są bakterie Gram-ujemne. Formy przetrwalne są z kolei bardziej odporne na ultradźwięki, w porównaniu z postaciami wegetatywnymi mikroorganizmów (Murray i in., 2016; Nosowska, 1999).

#### KONTROLA PROCESU STERYLIZACJI

Kontrola przebiegu procesu wyjaławiania jest obowiązkowa. Składają się na nią kontrola sterylizatorów i ekspozycji oraz kontrola wsadu i pakietu. Kontrola wewnętrzna jest obowiązkiem użytkownika i obejmuje kontrolę fizyczną, chemiczną i biologiczną. Kontrola zewnętrzna należy do obowiązków Państwowej Inspekcji Sanitarnej i obejmuje kontrolę biologiczną (Nosowska, 1999).

Kontrola fizyczna procesu sterylizacji odbywa się przy użyciu wskaźników fizycznych i podaje informacje o stanie technicznym urządzenia sterylizującego zgodnie ze wskazaniem zegara, termometru, manometru.

Kontrola chemiczna procesu wyjaławiania odbywa się przy użyciu wskaźników chemicznych. Określa warunki procesu sterylizacji wewnątrz komory sterylizatora. Norma kontroli jest oparta na reakcji chemicznej substancji wchodzących w skład wskaźnika. Wynik reakcji jest widoczny jako zmiana barwy wskaźnika, gdy proces sterylizacji osiągnie odpowiednie parametry. Kontrola chemiczna jest przeprowadzana dla danej ekspozycji (tzw. sprawdzian sterylizacji) oraz każdego wsadu i pakietu. Kontrola ekspozycji sygnalizuje, że opakowanie było poddane sterylizacji, ale nie mówi o sterylności jego zawartości. Kontrolę wsadu i pakietu wykonuje się poprzez umieszczenie opakowanych wskaźników chemicznych w różnych punktach komory sterylizatora (np. komory o pojemności poniżej 20 litrów wymaga zastosowania dwóch wskaźników, a komora o pojemności powyżej 20 litrów – minimum trzech). Prawidłowe wybarwienie wskaźników zwalnia wsad do użycia. W chemicznej kontroli sterylizacji posługujemy się barwnymi przyklepkami, służącymi do odróżnienia materiałów poddanych sterylizacji od materiałów nie poddanych temu procesowi (czyli do kontroli ekspozycji – kleja się nimi od zewnątrz sterylizowany przedmiot), a także wskaźnikami paskowymi i rurkowymi (do kontroli wsadu i pakietu).

Kontrola biologiczna procesu sterylizacji wymaga użycia wskaźników biologicznych i podaje informacje o fakcie zabicia drobnoustrojów wskaźnikowych w procesie sterylizacji. Wskaźniki biologiczne zawierają endospory wyselekcjonowanych, niepatogennych szczepów bakterii, wysoce opornych na czynnik sterylizujący. Endospory te są zdolne do przejścia w formę wegetatywną. Sporal S zawiera endospory z gatunku *Bacillus atrophaeus* w ilości  $10^8$ – $10^9$  i jest stosowany do kontroli procesu wyjaławiania suchym, gorącym powietrzem oraz tlenkiem etylenu (wynik kontroli wydaje się po 7 dniach). Sporal A, w którym znajdują się endospory *Geobacillus stearothermophilus* w ilości  $3 \times 10^6$ , jest wykorzystywany do kontroli sterylizacji parą wodną w nadciśnieniu (wynik po 7 dniach). 3M Attest zawiera spory bakteryjne wraz z pożywką i jest stosowany do kontroli sterylizacji parą wodną w nadciśnieniu (wynik po 7 dniach). Test TE i test 3M Attest Rapid pozwalają uzyskać wynik kontroli biologicznej odpowiednio po 24–48 godzinach i po 1–3 godzinach (Nosowska, 1999).

Kontrola wewnętrzna przy użyciu wskaźników biologicznych jest wykonywana okresowo, co najmniej raz w miesiącu (im częściej, tym lepiej), dla każdego sterylizatora, dla cykli sterylizacji o różnych parametrach i po każdej naprawie lub dłuższej przerwie w pracy urządzenia. Rejestracja

kontroli sterylizacji jest obowiązkowa dla wszystkich procesów sterylizacji i wszystkich sterylizowanych materiałów. Protokół sterylizacji produktu zawiera datę sterylizacji, rodzaj załadunku, wyniki kontroli fizycznej, chemicznej, biologicznej. Dokumentacja powinna być przechowywana przez 10 lat.

Steryлизację uznano za proces specjalny, czyli taki, którego rezultatu nie można zweryfikować przez sprawdzenie produktu końcowego (sterylnego) – możliwa jest tylko kontrola przebiegu procesu wyjąławiania. Proces sterylizacji każdorazowo musi osiągać wymagany poziom bezpieczeństwa – prawidłowo przeprowadzony gwarantuje, że ryzyko uzyskania produktu niejąłowego jest mniejsze niż 1:1 000 000 (Heczko i in., 2015).

## Bibliografia

- Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). 2019. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta. Dostępne online: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/environmental-guidelines-P.pdf> (dostęp: 15.09.2021).
- Heczko P., Wróblewska M., Pietrzyk A. 2015. *Mikrobiologia Lekarska*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Heczko P.B., Wójkowska-Mach J. 2009. *Zakażenia szpitalne. Podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Kutrowska E. 2006. Wyrób medyczny czy preparat biobójczy – kategorie środków dezynfekcyjnych. *Zakażenia* 6(4), str. 6–12.
- Ling M.L., Ching P., Widaditaputra A., Stewart A., Sirijindadirat N., Thu L.T.A. 2018. APSIC guidelines for disinfection and sterilization of instruments in health care facilities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 7, nr art. 25. DOI: [10.1186/s13756-018-0308-2](https://doi.org/10.1186/s13756-018-0308-2).
- Lipińska-Ojrzanowska A., Walusiak-Skorupa J. 2014. Quaternary ammonium compounds – new occupational hazards. *Medycyna Pracy* 65(5), str. 675–682. DOI: [10.13075/mp.5893.00056](https://doi.org/10.13075/mp.5893.00056).
- Munakata N., Kuo J. 2016. Disinfection processes. *Water Environment Research* 88(10), str. 1192–1229. DOI: [10.2175/106143016X14696400494696](https://doi.org/10.2175/106143016X14696400494696).
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2016. *Medical microbiology*, wyd. 8. Elsevier, Philadelphia.
- Nosowska K. 1999. *Podstawy sterylizacji i dezynfekcji w zwalczaniu zakażeń szpitalnych*, wyd. 1. Wydawnictwo Czelej, Lublin.
- Pittet D., Allegranzi B., Boyce J., World Health Organization World Alliance for Patient Safety First Global Patient Safety Challenge Core Group of Experts. 2009. The World Health Organization Guidelines on Hand Hygiene in Health Care and their consensus recommendations. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 30(7), str. 611–622. DOI: [10.1086/600379](https://doi.org/10.1086/600379).
- Rutala W.A., Weber D.J. 2013. Disinfection and sterilization: an overview. *American Journal of Infection Control* 41(5 Suppl), str. S2–S5. DOI: [10.1016/j.ajic.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.11.005).
- Rutala W.A., Weber D.J. 2016. Disinfection and sterilization in health care facilities: an overview and current issues. *Infectious Disease Clinics of North America* 30(3), str. 609–637. DOI: [10.1016/j.idc.2016.04.002](https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.04.002).
- Rutala W.A., Weber D.J. 2019. Disinfection, sterilization, and antisepsis: an overview. *American Journal of Infection Control* 47(Suppl), str. A3–A9. DOI: [10.1016/j.ajic.2019.01.018](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.01.018).
- Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R. 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 3(2), str. 168–171. DOI: [10.1016/j.nano.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001).
- Teper P., Stachurek I. 2016. Oddziaływanie na zdrowie człowieka i środowisko czwartorzędowych amin jako składników środków dezynfekcyjnych. *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Zarządzania Ochroną Pracy w Katowicach* 1(12), str. 113–122.
- Ustawa z dnia 10 października 1991 roku o środkach farmaceutycznych, materiałach medycznych, aptekach, hurtowniach i nadzorze farmaceutycznym. 1991. Dostępne online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.aspx?id=WDU19911050452> (dostęp: 02.11.2022).



- Weber D.J., Rutala W.A., Anderson D.J., Chen L.F., Sickbert-Bennett E.E., Boyce J.M. 2016. Effectiveness of ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems for terminal room decontamination: focus on clinical trials. *American Journal of Infection Control* 44(5 Suppl), str. 77–84. DOI: [10.1016/j.ajic.2015.11.015](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.015).
- WHO (World Health Organization). 2009. Wytyczne WHO dotyczące higieny rąk w opiece zdrowotnej – podsumowanie. Dostępne online: <https://www.cmj.org.pl/clean-care/higiena-rak-wytyczne-who-draft.pdf> (dostęp: 15.09.2021).
- Zych M., Górską E., Jankiewicz U., Kowalczyk P. 2013. Środki dezynfekcyjne oraz skuteczność ich działania na drobnoustroje skóry. *Nowa Medycyna* 1, str. 31–34.

# ROZDZIAŁ V. METODY ZWALCZANIA BAKTERII – LEKI PRZECIWBAKTERYJNE

CHAPTER V.  
METHODS USED TO CONTROL BACTERIA –  
ANTIBACTERIAL DRUGS



## Wprowadzenie

Termin „antybiotyk” wywodzi się od dwóch greckich słów: *anti* (przeciw) i *bios* (życie). Antybiotyki to naturalna lub syntetyczna substancja, wykazująca bójczą lub statyczną aktywność wobec bakterii. Leki z grupy antybiotyków początkowo były otrzymywane w sposób naturalny z hodowli grzybów (najczęściej) lub bakterii. Obecnie wiele z nich wytwarza się sztucznie, w wyniku modyfikacji związku naturalnego lub poprzez kompletną chemiczną syntezę substancji obecnej w naturze. Rozwój nauki i techniki pozwolił także na otrzymywanie syntetycznych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, zwanych chemioterapeutykami. Nie posiadają one naturalnych odpowiedników w przyrodzie, przez co nie mogą być zaliczane do antybiotyków.

W piśmiennictwie medycznym coraz częściej zamiennie używa się terminów „antybiotyk” i „chemioterapeutyk”. Wynika to z faktu, że dwa anglojęzyczne określenia – zarówno *antibiotic* (oznaczające antybiotyk), jak i *antimicrobial* (oznaczające każdy lek przeciwdrobnoustrojowy), czyli „antybiotyk” i „chemioterapeutyk” – otrzymują przeważnie jedno tłumaczenie, jako „antybiotyk”. Leki przeciwdrobnoustrojowe muszą cechować się wybiórczą toksycznością – w makroorganizmie powinny osiągać stężenia względnie dla niego obojętne, mające jednocześnie niekorzystny wpływ na mikroorganizmy wywołujące infekcję.

Antybiotyki stosuje się przede wszystkim w leczeniu wszelkiego rodzaju zakażeń bakteryjnych, jak również – w uzasadnionych przypadkach – profilaktycznie, np. okołooperacyjnie w chirurgii czy w celu zapobieżenia infekcyjnemu zapaleniu wśierdza przed zabiegami stomatologicznymi.

Odkrycie przez Alexandra Fleminga pierwszego antybiotyku, penicyliny, było fundamentem i kamieniem milowym dla rozwoju medycyny. Już wtedy dzięki wprowadzeniu penicyliny do lecznictwa, zmniejszeniu uległy wskaźniki śmiertelności wśród pacjentów po zabiegach operacyjnych, a przeszczepy narządów, które wcześniej nie były możliwe, stały się z czasem jedną ze standardowych procedur medycznych. Nieuleczalne dotąd i obarczone dużym ryzykiem zgonu infekcje bakteryjne przestały prowadzić do śmierci pacjentów, wiele z tych chorób jesteśmy w stanie wyleczyć.

Niemniej już sam Fleming przewidywał wyzwania, jakim w przyszłości będą musiały sprostać antybiotyki. Zdawał sobie sprawę, że pojawią się bakterie antybiotykooporne, w tym szczepy wielolekooporne. Ważnym środkiem zapobiegania rozprzestrzenianiu się zjawiska antybiotykooporności wśród prokariotów jest stosowanie przez lekarzy zasad racjonalnej antybiotykoterapii: do leczenia infekcji należy wybrać antybiotyk skuteczny wobec jej czynnika etiologicznego, bezpieczny dla pacjenta, o możliwie najwygodniejszym sposobie dawkowania, a jego użycie powinno być obarczone jak najmniejszym ryzykiem powstania i szerzenia się wielolekooporności (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022; Hryniewicz i Mészáros, 2002).

W przypadku stwierdzenia zakażenia decyzja o wyborze leku przeciwdrobnoustrojowego jest uzależniona od czynnika etiologicznego i jego lekowrażliwości, jak również od ciężkości zakażenia, możliwych dróg podania (np. czy chory jest w stanie przyjmować lek drogą doustną albo czy dany lek można w ten sposób w ogóle podawać), stwierdzonego w wywiadzie lekarskim uczulenia na antybiotyk, wydolności nerek i wątroby oraz stosowanych wcześniej antybiotyków i innych leków (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022; Hryniewicz i Mészáros, 2002). Niezwykle cenne w praktyce klinicznej są rekomendacje przygotowywane na bieżąco m.in. w ramach Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków ([www.antybiotyki.edu.pl](http://www.antybiotyki.edu.pl)). Publikowane wytyczne przeznaczone są dla lekarzy wszystkich specjalności, a szczególnie dla lekarzy rodzinnych, pediatrów i internistów (Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

W niniejszym rozdziale przedstawiono podstawowe informacje na temat leków przeciwbakteryjnych. Ponadto omówiono metody oznaczania lekowrażliwości bakterii i zasady interpretacji uzyskanych wyników. Przyjmowanie leków o aktywności przeciwbakteryjnej nie pozostaje obojętne dla organizmu człowieka, dlatego też w ostatniej części rozdziału podano ich najważniejsze działania niepożądane.

## Podział leków o działaniu przeciwbakteryjnym

W procesie leczenia przeciwdrobnoustrojowego używa się leków wykazujących aktywność wobec różnych grup mikroorganizmów, takich jak bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy.

Do leków aktywnych wobec grzybów zalicza się np. gryzeofulwinę, nystatynę, amfoterycynę B, hachimycynę (Robbins i in., 2016). Lekami wykazującymi aktywność wobec pierwotniaków są m.in. fumagilina i trychomycyna (Capela i in., 2019). Aktywnością przeciwwirusową charakteryzują się także związki jak np. acyklowir, gancyklowir, oseltamiwir, zanamiwir, lamiwudyna, telbiwudyna, tenofowir (Balfour, 1999; Nováková i in., 2018a; Nováková i in., 2018b; Poole i Kimberlin, 2017).

W tym rozdziale monografii skoncentrowano się na związkach o aktywności przeciwbakteryjnej. Aby uporządkować niezwykle obszerną wiedzę, dokonano podziału leków przeciwbakteryjnych na kilka grup w zależności od spektrum ich działania, docelowego miejsca działania i efektu działania.

Niektóre leki przeciwbakteryjne działają w wąskim zakresie, czyli posiadają tzw. wąskie spektrum aktywności (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022). Są to np. leki działające głównie na drobnoustroje Gram-dodatnie (m.in. benzylopenicyliny, makrolidy, linkozamidy, rifampicyna, wankomycyna) lub aktywne głównie wobec mikroorganizmów Gram-ujemnych (m.in. aminoglikozydy, polimyksyny, monobaktamy). Przykładem tego typu związków są też leki przeciwpłatkowe, np. te stosowane w terapii gruźlicy (m.in. cykloseryna, wiomycyna, streptomycyna).

Dostępne są również leki przeciwbakteryjne o szerokim zakresie działania, które mają tzw. szerokie spektrum aktywności (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022), np. ampicylina, cefalosporyny II i III generacji, tetracykliny, chloramfenikol, karbapenemy.

Ze względu na efekt działania leki przeciwbakteryjne podzielono na bójcze – zabijające żywe komórki bakteryjne (m.in. antybiotyki beta-laktamowe, aminoglikozydy, polimyksyny, glikopeptydy, ryfamycyny) i statyczne – hamujące wzrost i podziały komórkowe, ale nie zabijające bakterii (m.in. makrolidy, chloramfenikol, tetracykliny, linkozamidy, kwas fusydowy) (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022).

Ze względu na mechanizm działania wyróżniono leki przeciwbakteryjne zaburzające:

- syntezę ściany komórkowej,
- funkcje błon komórkowych,
- proces transkrypcji,
- biosyntezę białek,
- replikację i utrzymywanie struktury DNA,
- specyficzne i ważne dla określonych grup bakterii szlaki metaboliczne (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022).

Obecnie w lecznictwie stosuje się następujące leki przeciwbakteryjne (podział uwzględnia ich budowę chemiczną): antybiotyki beta-laktamowe, glikopeptydy, lipoglikopeptydy, fosfomycynę, polimyksyny, lipopeptydy, ryfamycyny, lipiarmycyny, nitroksolinę, aminoglikozydy, tetracykliny, glicylocykliny, makrolidy, ketolidy, linkozamidy, streptograminy, chloramfenikol, oksazolidynony, kwas fusydowy, mupirocynę, chinolony, nitroimidazole, sulfonamidy, trimetoprim, nitrofurany.

Przedstawione wyżej klasyfikacje są istotne z praktycznego punktu widzenia. W dalszej części opracowania, w oparciu o te właśnie podziały, zaprezentowano najważniejsze, dostępne dziś w lecznictwie, grupy chemiczne leków przeciwbakteryjnych.

### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE SYNTEZĘ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Do związków przeciwdrobnoustrojowych zaburzających syntezę bakteryjnej ściany komórkowej zalicza się głównie antybiotyki beta-laktamowe, glikopeptydy, lipoglikopeptydy i fosfomycynę.

Antybiotyki beta-laktamowe hamują aktywność tzw. białek wiążących penicyliny (ang. *penicillin-binding proteins*, PBP), czyli transpeptydaz i karboksypeptydaz, enzymów biorących udział w biosyntezie mureiny (peptydoglikanu). Enzymy te rozpoznają dipeptyd D-Ala-D-Ala (tj. D-alanylo-

-D-alaninę). Omawiane leki trwale wiążą się z PBP i skutecznie blokują ich aktywność enzymatyczną (Bazan i in., 2009; Basetti i in., 2008; Bush i Bradford, 2016; Bush i Macielag, 2010; Rolinson, 1986).

Antybiotyki beta-laktamowe to niezwykle złożona grupa leków przeciwbakteryjnych, na którą składają się:

- penicyliny,
- cefalosporyny,
- monobaktamy,
- karbapenemy,
- połączenia z inhibitorami beta-laktamaz.

W Tabeli 1 przedstawiono ich najważniejsze przykłady oraz podstawowe informacje na temat spektrum aktywności.

**Tabela 1.** Antybiotyki beta-laktamowe (Bush i Bradford, 2016; Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

PENICYLINY		
Podgrupy leków	Przykłady leków	Uwagi
Penicyliny naturalne	penicylina G <sup>1</sup> penicylina V <sup>2</sup>	aktywne wobec paciorkowców, gronkowców, enterokoków; naturalna oporność występuje wśród pałeczek Gram-ujemnych
Penicyliny izoksazolilowe	oksacylina kloksacylina flukloksacylina nafcyлина metrylina <sup>3</sup>	aktywne wobec paciorkowców i gronkowców; naturalna oporność występuje wśród pałeczek Gram-ujemnych i enterokoków
Aminopenicyliny	ampicylina amoksycyлина	aktywne wobec ziarenkowców Gram-dodatnich i niektórych pałeczek Gram-ujemnych ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> )
Karboksypenicyliny	karbenicylina tikarcyлина	aktywne wobec ziarenkowców Gram-dodatnich (z wyłączeniem enterokoków) i pałeczek Gram-ujemnych (w tym <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i większości gatunków rzędu <i>Enterobacterales</i> – z wyłączeniem rodzaju <i>Klebsiella</i> )
Acyloureidopenicyliny	azlocyлина mezlocyлина	aktywne wobec ziarenkowców Gram-dodatnich, pałeczek rzędu <i>Enterobacterales</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> ,
Piperazynopenicyliny	piperacylina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Tabela 1.** Antybiotyki beta-laktamowe... (cd.)

CEFALOSPORNY		
Podgrupy leków	Przykłady leków	Uwagi
I generacji	Grupa 1 cefalotyna cefazolina cefalorydyna  Grupa 2 cefaleksyna cefradyna	aktywne wobec Gram-dodatnich ziarenkowców i w mniejszym stopniu wobec Gram-ujemnych pałeczek (grupa 1 to tzw. cefalosporiny przeciwgronkowcowe, grupa 2 – tzw. cefalosporiny przeciwenteryjne); enterokoki są naturalnie odporne na wszystkie cefalosporiny
II generacji	cefaklor cefamandol karbacefemy (lorakarbef) cefamycyny (cefoksytyna <sup>4</sup> , cefmetazol, cefotetan) oksacefemy (moksalaktam) oksymino-cefalosporiny (cefuroksym)	mają szerszy zakres działania wobec pałeczek Gram-ujemnych oraz większą stabilność wobec beta-laktamaz
III generacji	cefotaksym ceftriakson ceftazydym cefpodoksym cefmenoksym cefdinir ceftiofur	aktywne wobec ziarenkowców Gram-dodatnich i pałeczek Gram-ujemnych
IV generacji	cefepim cefpirom cefzopran	
tzw. V generacji	ceftarolina ceftobiprol ceftolozan <sup>5</sup>	aktywne wobec szczepów MRSA
Sideroforowe	cefiderokol <sup>6</sup>	aktywny wobec szczepów KPC, OXA-48, NDM (ang. <i>New Delhi metallo-beta-lactamase</i> ); „koń trojański”

**Tabela 1.** Antybiotyki beta-laktamowe... (cd.)

<b>MONOBAKTAMY</b>		
<b>Podgrupy leków</b>	<b>Przykłady leków</b>	<b>Uwagi</b>
(nie dotyczy)	aztreonam	nieaktywny wobec bakterii Gram-dodatnich i bakterii beztlenowych
<b>KARBAPENEMY</b>		
<b>Podgrupy leków</b>	<b>Przykłady leków</b>	<b>Uwagi</b>
(nie dotyczy)	meropenem imipenem ertapenem doripenem biapenem	najszerze działanie na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne oraz szczepy wytwarzające beta-laktamazy; naturalna oporność np. u <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b>POŁĄCZENIA Z INHIBITORAMI BETA-LAKTAMAZ</b>		
<b>Podgrupy leków</b>	<b>Przykłady leków</b>	<b>Uwagi</b>
Penicyliny z inhibitorami	amoksycylina z klawulanianem	aktywne wobec wytwarzających beta-laktamazy klasy A szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich i pałeczek Gram-ujemnych
	piperacylina z tazobaktamem	
Cefalosporyny z inhibitorami	ampicylina z sulbaktamem	
	ceftolozan z tazobaktamem	aktywność wobec szczepów ESBL (ang. <i>extended-spectrum beta-lactamases</i> ), brak aktywności w stosunku do bakterii wytwarzających karbapenemazy
	ceftazydym z awibaktamem	aktywność wobec szczepów <i>Enterobacteriaceae</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESBL, AmpC (ang. <i>AmpC cephalosporinase</i> ), KPC (ang. <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> ), OXA-48 (ang. <i>oxacillinase-48</i> ), brak aktywności wobec szczepów MBL (ang. <i>metallo-beta-lactamase</i> ) i <i>Acinetobacter baumannii</i> , zmniejszona aktywność w stosunku do bakterii beztlenowych
	fosamil ceftaroliny z awibaktamem	aktywność wobec szczepów <i>Enterobacteriaceae</i> ESBL, AmpC, KPC i niektórych szczepów OXA-48; brak aktywności w stosunku do <i>Acinetobacter baumannii</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	cefepim z zidebaktamem	aktywność wobec szczepów <i>Enterobacteriaceae</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESBL, AmpC, KPC, MBL

**Tabela 1.** Antybiotyki beta-laktamowe (cd.)

Monobaktamy z inhibitorami	aztreonam z awibaktamem	aktywność wobec szczepów <i>Enterobacteriaceae</i> ESBL, AmpC, KPC, OXA-48, MBL; tak samo aktywne jak aztreonam w monoterapii w stosunku do <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Acinetobacter</i> spp.
Karbapenemy z inhibitorami	meropenem z waborbaktamem	aktywność wobec szczepów <i>Enterobacteriaceae</i> ESBL, AmpC, KPC, tak samo aktywne jak meropenem w monoterapii w stosunku do <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. i <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	meropenem z nakubaktamem	aktywność wobec szczepów AmpC i KPC
	imipenem z cilasatyną i relebaktamem	aktywność wobec szczepów <i>Enterobacteriaceae</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESBL, AmpC, KPC; brak aktywności w stosunku do <i>Acinetobacter baumannii</i>

<sup>1</sup> Inaczej: benzylopenicylina, penicylina krystaliczna

<sup>2</sup> Inaczej: fenoksymetylopenicylina

<sup>3</sup> Stosowana wyłącznie w diagnostyce (w przeszłości używana do badania oporności gronkowców na antybiotyki beta-laktamowe, tj. metycyliny-oporności; obecnie zastąpiona przez cefoksytynę)

<sup>4</sup> Stosowana wyłącznie w diagnostyce (zastąpiła metycylinę w badaniu oporności gronkowców na antybiotyki beta-laktamowe, tj. metycyliny-oporności)

<sup>5</sup> Lek budową zbliżony do cefalosporyn III generacji – brak konsensusu w źródłach

<sup>6</sup> Lek budową zbliżony do cefalosporyn IV generacji – brak konsensusu w źródłach

Glikopeptydy (wankomycyna, teikoplanina, oritawancyna) zaburzają syntezę ściany komórkowej poprzez łączenie się z wczesnym prekursorem mureiny i blokowanie transglikozylacji (wydłużania łańcucha cukrowego) oraz transpeptydacji (procesu sieciowania) tego polimeru (Finch i Eliopoulos, 2005; Jeya i in., 2011; Shan i in., 2020). Lipoglikopeptydy (telawancyna, dalbawancyna) łączą się z D-alanylo-D-alaniną, przez co hamują poprzeczne sieciowanie mureiny (Mattox i in., 2016; Nailor i Sobel, 2009).

Glikopeptydy i lipoglikopeptydy są aktywne wobec ziarenkowców Gram-dodatnich (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020). Bakterie z rodzajów *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* i *Mycobacterium* oraz gatunków *Enterococcus casseliflavus* i *Enterococcus gallinarum* wykazują oporność na te leki. Bakterie Gram-ujemne są naturalnie odporne na glikopeptydy i lipoglikopeptydy, ponieważ błona zewnętrzna ściany komórkowej tych drobnoustrojów jest nieprzepuszczalna dla antybiotyków hydrofilowych (poryny są zbyt małe).

Kolejnym przykładem substancji przeciwdrobnoustrojowej zaburzającej syntezę peptydoglikanu jest fosfomycyna. Pod względem budowy chemicznej antybiotyk różni się od znanych leków przeciwbakteryjnych, charakteryzuje się m.in. niewielkim rozmiarem cząsteczki. Fosfomycyna jest aktywnie transportowana do wnętrza komórek prokariotycznych, gdzie na bardzo wczesnym etapie zaburza biosyntezę mureiny (Hryniewicz i Mészáros, 2002; Silver, 2017). Lek ma szerokie spektrum działania, wykazuje aktywność wobec licznych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Stosowany bywa głównie w zakażeniach dróg moczowych.

Wszystkie antybiotyki beta-laktamowe oraz glikopeptydy, lipoglikopeptydy i fosfomycynę łączą dwie cechy: aktywność funkcjonalna (zaburzenie biosyntezy ściany komórkowej) i efekt działania (są to leki bakteriobójcze).



#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE FUNKCJE BŁON KOMÓRKOWYCH

Do związków przeciwbakteryjnych zaburzających funkcje błon komórkowych należą polimyksyny i lipopeptydy.

Polimyksyny to związki z grupy antybiotyków polipeptydowych, do których zalicza się kolistynę (polimyksynę E). Poprzez interakcję z lipidowymi składnikami zaburzają funkcje zewnętrznej błony ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, przez co dochodzi do rozluźnienia jej struktury i organizacji. Polimyksyny są aktywne wobec bakterii Gram-ujemnych z wyjątkiem *Proteus* spp., *Burkholderia cepacia* i *Bacteroides fragilis*. Wszystkie bakterie Gram-dodatnie są naturalnie odporne na polimyksyny (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Li i Velkov, 2019; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Lipopeptydy zaburzają funkcje błony cytoplazmatycznej w komórkach bakterii Gram-dodatnich, poprzez jej depolaryzację i ucieczkę jonów potasu (to główny mechanizm działania tych antybiotyków). Dodatkowo hamują też syntezę kwasów nukleinowych i białek. Aktywność lipopeptydów zależy od obecności jonów wapnia. Leki, których przedstawicielem jest daptomycyna, są aktywne wobec ziarenkowców Gram-dodatnich (Hryniewicz i in., 2020; Karas i in., 2020; Dzierżanowska, 2019; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Polimyksyny i lipopeptydy wykazują w stosunku do bakterii efekt bójczy.

#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE PROCES TRANSKRYPCJI

Do związków przeciwbakteryjnych zaburzających proces transkrypcji, czyli przepisywania informacji zawartej w DNA na RNA, należą ryfamycyny, lipiarmycyny i nitroksolina.

Ryfamycyny blokują aktywność polimerazy RNA zależnej od DNA. Do grupy tej należy rifampicyna, ansamycynowy antybiotyk półsyntetyczny, będący pochodną ryfamycyny B. Lek jest bójczy wobec drobnoustrojów z rodzaju *Mycobacterium*. Stosuje się go głównie w leczeniu gruźlicy. *In vitro* rifampicyna hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza gronkowców, a także bakterii Gram-ujemnych, np. *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella* spp. W przypadku leczenia rifampicyną uzyskanie spodziewanego efektu terapeutycznego wymaga czasu, dlatego należy ją stosować zawsze w terapii skojarzonej z innymi lekami przeciwbakteryjnymi (Chen i Kaye, 2009; Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020). Do grupy ryfamycyn zalicza się również ryfaksyminę, lek stosowany w monoterapii w zakażeniach przewodu pokarmowego (Pimentel, 2009; Shayto i in., 2016).

Fidaksomycyna jest pierwszym dopuszczonym do obrotu antybiotykiem z grupy lipiarmycyn. Jej mechanizm działania polega na hamowaniu procesu transkrypcji poprzez blokowanie aktywności polimerazy RNA, jednak w innym miejscu uchwytu niż w przypadku ryfamycyn. Podana doustnie fidaksomycyna minimalnie wchłania się do krwi, działa w świetle jelit wybiórczo na mikroorganizmy z gatunku *Clostridioides difficile* oraz w minimalnym stopniu na inne bakterie Gram-dodatnie, które mogą stanowić mikrobiotę jelit. W warunkach *in vitro* wykazano też, że fidaksomycyna hamuje proces sporulacji *Clostridioides difficile* (Fitzpatrick i in., 2022; Louie i in., 2009; Srivastava i in., 2011). Działa bakteriobójczo. Bakterie Gram-ujemne są naturalnie odporne na ten lek.

Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania nitroksoliny opiera się na wybiórczym hamowaniu określonych enzymów, szczególnie polimerazy RNA, na drodze chelatowania dwuwartościowych jonów metali. Związek wykazuje działanie statyczne wobec bakterii (Gram-dodatnich i Gram-ujemnych), jak również wobec grzybów drożdżopodobnych. Osiąga stężenia terapeutyczne tylko w moczu. Ze względu na budowę cząsteczki i mechanizm działania nitroksoliny nie jest prawdopodobne powstanie oporności na lek w drodze mutacji jednostopniowych (Dziewierz i Lemańska, 2018; Mitrović i Kos, 2019).

#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE PROCES BIOSYNTETY BIAŁEK POPRZEZ WIĄZANIE Z PODJEDNOSTKĄ 30S RYBOSOMU

Do leków przeciwbakteryjnych zaburzających translację przez trwałe wiązanie z podjednostką rybosomalną 30S zalicza się aminoglikozydy, tetracykliny i glicylocykliny.

W Tabeli 2 podano najważniejsze przykłady antybiotyków aminoglikozydowych (z podziałem na generacje) i podstawowe informacje na temat spektrum ich aktywności. Wszystkie aminoglikozydy wywołują efekt bakteriobójczy.

**Tabela 2.** Antybiotyki aminoglikozydowe (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Podgrupy leków	Przykłady leków	Uwagi
I generacja	streptomycyna neomycyna kanamycyna	Nie działają na bakterie beztlenowe, są aktywne wobec tlenowych pałeczek Gram-ujemnych, pałeczek jelitowych i pałeczek niefermentujących (plazomycyna dodatkowo wykazuje aktywność wobec szczepów ESBL, KPC, OXA-48). Wykazują aktywność wobec ziarenkowców Gram-dodatnich z gatunków <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Staphylococcus epidermidis</i> (w stosunku do innych bakterii Gram-dodatnich ich aktywność jest ograniczona). Są aktywne wobec <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; w monoterapii stosowane wyłącznie do leczenia zakażeń układu moczowego.
II generacja	gentamicyna netylmicyna sisomicyna tobramycyna amikacyna	
III generacja	daktynomycyna sepamycyna	
Neoglikozydy	plazomycyna	

Do tetracyklin naturalnych należą: tetracyklina, chlorotetracyklina i oksytetracyklina. Tetracykliny półsyntetyczne to: doksycyklina i minocyklina. Do tetracyklin zalicza się również erawacyklinę, w której cząsteczce nie występują jednak substytucje C-7 i C-9, typowe dla tetracyklin naturalnych i półsyntetycznych. Wszystkie tetracykliny wykazują efekt bakteriostatyczny i mają bardzo szerokie spektrum aktywności. Są aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i atypowych (w tym riketsji), a także krętków. Nie działają na szczepy *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Serratia* spp. Erawacyklina jest skuteczna wobec szczepów KPC, OXA-48 i NDM (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Vincent i in., 2007; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Do grupy glicylocyklin zalicza się pochodną minocykliny – tigecyklinę. Glicylocyklina są aktywne wobec szczepów MRSA i VRE (ang. *vancomycin-resistant enterococci*), szczepów ESBL-dodatnich i AmpC-dodatnich, tlenowców i beztlenowców. Wykazują zróżnicowaną aktywność wobec *Acinetobacter* spp. i brak aktywności wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Działają bakteriostatycznie (Doan i in., 2006; Dzierżanowska, 2019; Hryniewicz i in., 2020; Vincent i in., 2007; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE PROCES BIOSYNTETY BIAŁEK POPRZEZ WIĄZANIE Z PODJEDNOSTKĄ 50S RYBOSOMU

Do leków przeciwbakteryjnych zaburzających translację przez wiązanie z podjednostką rybosomalną 50S zalicza się makrolidy, ketolidy, linkozamidy, streptograminy i chloramfenikol. Niemal wszystkie (poza chloramfenikolem) wywołują efekt bakteriostatyczny. Chloramfenikol, w zależności od stężenia, może wywoływać efekt bakteriostatyczny lub bakteriobójczy. W Tabeli 3 wymieniono najważniejsze przykłady leków należących do wyżej wymienionych grup chemicznych. Zaprezentowano także najistotniejsze informacje na temat spektrum ich aktywności.

**Tabela 3.** Leki przeciwbakteryjne, zaburzające biosyntezę białek przez wiązanie z podjednostką 50S rybosomu (Balbi, 2004; Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Mast i Wohlleben, 2014; Spížek i Řezanka, 2017; Vázquez-Laslop i Mankin, 2018; Zhanel i in., 2002; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Przykłady leków	Uwagi
<b>MAKROLIDY</b>	
Erytromycyna, azytromycyna, klarytromycyna, roksytromycyna	Leki aktywne wobec paciorkowców i gronkowców, bakterii atypowych, nie wykazują natomiast aktywności wobec pałeczek rzędu <i>Enterobacterales</i> i Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących.
<b>KETOLIDY</b>	
Telitromycyna	Lek aktywny wobec paciorkowców (poza szczepami MLS – ang. <i>macrolides-lincosamides-streptogramin B</i> ), gronkowców (poza szczepami MLS i MRSA – zazwyczaj) i bakterii atypowych; nie wykazuje aktywności w stosunku do pałeczek rzędu <i>Enterobacterales</i> i Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących oraz <i>Mycobacterium spp.</i>
<b>LINKOZAMIDY</b>	
Klindamycyna	Aktywna wobec gronkowców i paciorkowców, bakterii beztlenowych i <i>Mycoplasma hominis</i> ; brak aktywności wobec enterokoków, pałeczek jelitowych, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Haemophilus spp.</i> , <i>Neisseria spp.</i> i <i>Nocardia spp.</i>
<b>STREPTOGRAMINY</b>	
Chinupristina-dalfopristina	Lek wykazuje aktywność w stosunku do wielu bakterii Gram-dodatnich (nie działa na <i>Enterococcus faecalis</i> ) i nielicznych bakterii Gram-ujemnych.

**Tabela 3.** Leki przeciwbakteryjne zaburzające biosyntezę białek... (cd.)

<b>CHLORAMFENIKOL</b>	
Chloramfenikol	Wykazuje efekt bakteriostatyczny w stosunku do większości tlenowych i beztlenowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, bakterii atypowych i riketsji, ale jest bakteriobójczy wobec gatunków wywołujących zapalenie ośrodkowego układu nerwowego ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> ); ze względu na wysoką toksyczność chloramfenikol nie może być stosowany jako lek pierwszego rzutu.

LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE PROCES BIOSYNTETY BIAŁEK POPRZEZ BLOKOWANIE POWSTAWANIA KOMPLEKSU RYBOSOMALNEGO 70S

Do związków przeciwbakteryjnych, zaburzających translację przez blokowanie tworzenia rybosomalnego kompleksu 70S, niezbędnego do inicjacji syntezy białka, należą oksazolidynony. Substancje z tej grupy wiążą się z wybranymi miejscami podjednostki 50S rybosomu bakteryjnego, uniemożliwiając w ten sposób powstanie kompleksu 70S (Shaw i Barbachyn, 2011). W Tabeli 4 podano przykłady leków z grupy oksazolidynonów (z podziałem na generacje), efekt działania i podstawowe informacje na temat spektrum ich aktywności.

**Tabela 4.** Oksazolidynony (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Shaw i Barbachyn, 2011; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

<b>Podgrupy leków</b>	<b>Przykłady leków</b>	<b>Uwagi</b>
I generacja	linezolid	aktywny wobec tlenowych bakterii Gram-dodatnich, w tym szczepów wieloopornych (MRSA, VISA – ang. <i>vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i> , VRSA – ang. <i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> , VRE, PRP – ang. <i>penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae</i> ); jest bakteriobójczy w stosunku do niektórych paciorkowców (np. <i>Streptococcus pneumoniae</i> ), <i>Bacteroides fragilis</i> i <i>Clostridium perfringens</i> , ale bakteriostatyczny wobec gronkowców i enterokoków
II generacja	tedizolid	aktywny wobec tlenowych bakterii Gram-dodatnich, w tym szczepów wieloopornych (MRSA, VISA, VRSA, VRE, PRP); wykazuje efekt bakteriobójczy

#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE PROCES BIOSYNTETY BIAŁEK PRZEZ WIĄZANIE Z RYBOSOMALNĄ TRANSLOKAZĄ

Kwas fusydowy hamuje biosyntezę białka poprzez wiązanie się z translokazą rybosomalną, tj. czynnikiem elongacji G znajdującym się w obrębie podjednostki 50S rybosomu bakteryjnego. W konsekwencji niemożliwe jest przesunięcie ramki odczytu na kolejny kodon nici mRNA. Hamowaniu ulega wydłużanie łańcucha białkowego. Kwas fusydowy wykazuje aktywność wobec MRSA, gronkowców koagulazo-ujemnych, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium* spp. i bakterii beztlenowych. Oporność na ten lek występuje wśród pałeczek rzędu *Enterobacterales* i bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Kwas fusydowy wywołuje efekt bakteriostatyczny (w wysokich stężeniach jest natomiast bakteriobójczy) (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Turnidge, 1999; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE BIOSYNTEZĘ BIAŁEK PRZEZ WIĄZANIE Z SYNTETAZĄ IZOLEUCYLO-TRNA

Zaburzenie syntezy białek poprzez wiązanie z syntetazą izoleucylo-tRNA (ang. *transfer ribonucleic acid*) to mechanizm działania mupirocyny, leku naturalnego, produktu fermentacji *Pseudomonas fluorescens*. Antybiotyk wykorzystywany jest w leczeniu zakażeń wywołanych przez wrażliwe szczepy *Staphylococcus aureus* i pozostałe gronkowce oraz paciorkowce. Lek w postaci maści do nosa stosuje się w celu eliminacji nosicielstwa *Staphylococcus aureus* (w tym MRSA) w jamie nosowej. Mupirocyna w minimalnym stężeniu hamującym wywołuje efekt bakteriostatyczny, ale w wyższych stężeniach jest już bakteriobójcza (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Tucaliuc i in., 2019; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE PROCES REPLIKACJI I UTRZYMANIE STRUKTURY DNA

Chinolony to leki zaburzające replikację i utrzymanie struktury DNA w komórce bakteryjnej. Odbywa się to przez łączenie chinolonów z gyrazą DNA i topoizomerazą IV. Celem działania leków jest kompleks DNA–enzym – następuje jego stabilizacja, co hamuje procesy replikacji i transkrypcji (Bush i in., 2020). Chinolony są bakteriobójcze. W Tabeli 5 podano najważniejsze przykłady leków z grupy chinolonów (z podziałem na generacje) oraz podstawowe informacje na temat spektrum ich aktywności.

**Tabela 5.** Chinolony (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Podgrupy leków	Przykłady leków	Uwagi
I generacja („stare” chinolony)	kwas nalidyksowy kwas pipemidowy flumechina cinoksacyna	ze względu na niedostateczne stężenie w surowicy i tkankach leki stosowane jedynie w leczeniu zakażeń układu moczowego
II generacja (klasyczne fluorochinolony)	norfloksacyna ciprofloksacyna ofloksacyna pefloksacyna lewofloksacyna	aktywne wobec większości Gram-ujemnych tlenowych pałeczek rzędu <i>Enterobacterales</i> , gronkowców, <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , bakterii atypowych i prątków

**Tabela 5.** Chinolony (cd.)

III generacja	sparfloksacyna	związki o poszerzonej i wzmożonej aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich oraz wzmożonej aktywności w stosunku do bakterii atypowych i beztlenowych
	gatifloksacyna	
	grepafloksacyna	
IV generacja	moksifloksacyna	związki o poszerzonej aktywności wobec bakterii beztlenowych oraz wzmożonej aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich, bakterii atypowych i bakterii beztlenowych
	trowafloksacyna	

Lekami przeciwbakteryjnymi, które również zaburzają proces replikacji i utrzymanie struktury DNA, są nitroimidazole. Dzieje się tak wskutek redukcji grup nitrowych w komórkach bakterii. Powstają wtedy pochodne cytotoksyczne, reaktywne rodniki, co odbywa się przy udziale ferrodoksyny (białka przenoszącego elektrony). Zjawisko występuje wyłącznie w organizmach z metabolizmem beztlenowym lub ubogim w tlen. Celem ataku nitroimidazoli jest bakteryjny łańcuch DNA, który ulega rozerwaniu. Metronidazol wykazuje aktywność w stosunku do bakterii beztlenowych, mykoplazm i pierwotniaków (nie jest aktywny wobec bakterii tlenowych i względnie beztlenowych). Tinidazol stosuje się w zakażeniach o etiologii bakteryjnej i pierwotniakowej. Zarówno metronidazol, jak i tinidazol wykazują efekt bakteriobójczy (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Zhang i in., 2019; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

#### LEKI PRZECIWBAKTERYJNE ZABURZAJĄCE SYNTEZĘ KWASU FOLIOWEGO I INNE SZLAKI METABOLIZMU KOMÓRKOWEGO

Sulfonamidy (np. sulfaguanidyna, sulfacetamid) hamują syntezę kwasu foliowego, koenzymu pełniącego istotną rolę w procesie wytwarzania zasad purynowych i pirymidynowych. Są to antagoniści PABA (ang. *para-aminobenzoic acid*) – enzymu niezbędnego do syntezy tego kwasu. Wykazują aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, działając statycznie (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; Hryniewicz i Mészáros, 2002; Smith i Powell, 2000; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Inną substancją wpływającą niekorzystnie na metabolizm kwasu foliowego u bakterii jest trimetoprim, który hamuje reduktazę kwasu foliowego i w efekcie blokuje syntezę puryn.

W praktyce klinicznej stosuje się trimetoprim-sulfametoksazol, połączenie sulfonamidu zwanego sulfametoksazolem z trimetoprimem. W ten sposób, dzięki hamowaniu metabolizmu kwasu foliowego na dwóch etapach równocześnie, uzyskuje się efekt bakteriobójczy.

Nitrofurany to grupa leków zaburzających szlaki metaboliczne komórki prokariotycznej. Działają wielokierunkowo: hamują aktywność licznych enzymów metabolizmu bakteryjnego, zaangażowanych w syntezę białek, procesy oddychania komórkowego, przemianę kwasu pirogronowego. Ważnym mechanizmem przeciwbakteryjnego działania nitrofuranów jest uszkodzenie DNA. Nitrofurany takie jak nitrofurantoina i furazydyna są stosowane w zakażeniach układu moczowego, po furazolidon i nifuroksazyd sięga się natomiast w przypadku bakteryjnych infekcji układu pokarmowego. Nitrofurazon stosuje się miejscowo. Nitrofurany wykazują aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (Dzierżanowska-Fangrat, 2022; Hryniewicz i in., 2020; McCalla, 1977; Żukowska i Hryniewicz, 2020). Wywołują efekt bakteriobójczy (Alam i in., 2019).

## Metody oznaczania lekowrażliwości bakterii oraz podstawowe zasady interpretacji wyników

Oznaczanie lekowrażliwości bakterii ma na celu uzyskanie informacji pozwalających na zoptymalizowanie terapii celowanej u chorego lub zaplanowanie skutecznego leczenia empirycznego. Umożliwia to również śledzenie epidemiologii oporności i jej narastania oraz uchwycenie momentu pojawienia się wśród szczepów bakteryjnych nowych mechanizmów oporności na określony lek przeciwdrobnoustrojowy. Oporności na leki przeciwbakteryjne, jednemu z największych wyzwań współczesnej medycyny, poświęcono kolejny rozdział monografii (Rozdział VI: Oporność bakterii na leki przeciwbakteryjne).

Do oznaczania lekowrażliwości bakterii stosuje się metody jakościowe i ilościowe. Zasady oznaczania i interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów regulują międzynarodowe organizacje normalizacyjne, m.in. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości EUCAST (ang. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) i amerykański Instytut Norm Klinikalnych i Laboratoryjnych CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (EUCAST, 2022).

Do metod jakościowych badania lekowrażliwości bakterii należy metoda dyfuzyjno-krążkowa (metoda Kirby'ego–Bauera). Wykorzystuje się w niej zjawisko powstawania gradientu stężeń w następstwie dyfuzji substancji czynnej z krążka antybiogramowego, zawierającego lek przeciwbakteryjny. Badanie wykonuje się na podłożu antybiogramowym (zwykle jest to Mueller-Hinton Agar) z równomiernie naniesioną zawiesiną bakterii o określonej liczbie komórek bakteryjnych. Odczyt (zwykle po 18–24-godzinnej inkubacji) polega na zmierzeniu średnicy strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju wokół krążka z lekiem (wynik podaje się w milimetrach). Metoda ta jest stosowana do oznaczania lekowrażliwości większości bakterii tlenowych, izolowanych z materiałów klinicznych w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej.

Metody ilościowe oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów pozwalają określić MIC leku (ang. *minimal inhibitory concentration*), czyli jego najmniejsze stężenie hamujące wzrost mikroorganizmów, wyrażane w mg/L lub µg/mL. Metody te są stosowane do oznaczania lekowrażliwości bakterii (także na podłożu Mueller-Hinton Agar) i grzybów. Wyróżniamy tu:

- metodę rozcieńczeń w agarze (lek obecny w podłożach agarowych w malejących stężeniach, na które jest posiewana zawiesina drobnoustrojów o określonej gęstości),
- metodę rozcieńczeń w bulionie (lek obecny w malejących stężeniach w probówkach z bulionem, do których jest dodawana zawiesina drobnoustrojów o określonej gęstości),
- pasek z gradientem stężeń leku (E-test, ang. *Epsilometer test*, metoda ta łączy cechy metody rozcieńczeniowej i metody dyfuzyjnej, opiera się na wytwarzaniu stabilnego, ciągłego gradientu stężeń leku w podłożu agarowym),
- metody automatyczne (pozwalają ustalić wartości MIC w zakresie tzw. punktów odcięcia, ang. *breakpoints*).

Niezwykle ważną częścią diagnostyki mikrobiologicznej jest prawidłowa interpretacja uzyskanych wyników badania lekowrażliwości patogenu. W tym celu należy rozumieć znaczenie pojęć: lekowrażliwość i lekooporność.

Zgodnie z obowiązującymi w Polsce normami EUCAST wyróżnia się następujące rodzaje lekowrażliwości drobnoustrojów:

- wrażliwość mikrobiologiczną,
- wrażliwość kliniczną,
- wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji (EUCAST, 2022).

O wrażliwości mikrobiologicznej mówi się, gdy dany szczep bakterii należy do najbardziej wrażliwej populacji (jest szczepem dzikim, nie posiada mechanizmów oporności nabytej na lek).

Wrażliwość kliniczna to wrażliwość drobnoustroju na standardowe dawki leku. Szczep bakterii klasyfikujemy jako klinicznie wrażliwy na podstawie oceny jego wrażliwości *in vitro* na określony antybiotyk, właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych leku oraz poprzez ustalenie

możliwego do osiągnięcia stężenia antybiotyku w miejscu zakażenia (stężenia możliwego do uzyskania w surowicy krwi).

Wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji: gdy mowa o szczepach bakteryjnych, które pod względem swej lekowrażliwości znajdują się pomiędzy szczepami klinicznie wrażliwymi a szczepami klinicznie opornymi, prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego jest trudne do oszacowania, ale – w przypadku niektórych leków przeciwbakteryjnych – sukces ów może zostać osiągnięty, jeśli użyje się tych leków w wyższej dawce lub zwiększy częstotliwość ich podawania, lub jeśli ulegną one wyjątkowo silnej koncentracji w miejscu toczącej się infekcji i osiągną tam wysokie stężenia (np. w układzie moczowym).

Zdefiniowano także kilka rodzajów lekooporności drobnoustrojów:

- oporność mikrobiologiczną,
- oporność kliniczną,
- oporność krzyżową,
- oporność naturalną,
- oporność nabytą (EUCAST, 2022).

O oporności mikrobiologicznej mówi się, gdy mikroorganizm posiada mechanizm oporności (wrodzony lub nabyty) na określony lek przeciwbakteryjny, demonstrowany fenotypowo lub genotypowo *in vitro* (tzw. oporność niskiego lub wysokiego stopnia).

W przypadku oporności klinicznej sukces terapeutyczny jest niemożliwy do osiągnięcia pomimo zastosowania maksymalnych dawek leku.

Oporność krzyżowa to niewrażliwość bakterii na wszystkie lub niektóre leki przeciwbakteryjne z tej samej grupy chemicznej (np. oporność na antybiotyki beta-laktamowe lub oporność na aminoglikozydy, lub oporność na makrolidy). Czasem jest to niewrażliwość drobnoustrojów na leki z kilku różnych grup (niepodobnych do siebie pod względem budowy chemicznej). Dzieje się tak, gdy miejsca docelowe leków znajdują się blisko siebie (np. oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B).

Oporność naturalna to stała cecha gatunku, rodzaju lub rodziny drobnoustrojów (np. oporność gatunkowo-specyficzna).

Oporność nabyta to nowa cecha szczepu bakterii, wynikająca ze zmian w jego materiale genetycznym uzyskanych na drodze mutacji lub transferu genów.

## **Działania niepożądane leków przeciwbakteryjnych**

Prowadzenie leczenia przeciwbakteryjnego musi wiązać się ze świadomością jego wpływu nie tylko na patogeny, ale także na organizm człowieka. Do najczęściej odnotowywanych działań niepożądanych terapii przeciwdrobnoustrojowej należą świąd, ból i obrzęk w miejscu podania leku w przypadku iniekcji oraz niekorzystny wpływ na naturalną mikrobiotę jelit i zaburzenia żołądkowo-jelitowe wskutek przyjmowania leku drogą doustną. W dalszej części rozdziału wymieniono najważniejsze działania niepożądane stosowanych obecnie leków przeciwbakteryjnych, ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na mikrobiotę jelit.

### **DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE LEKÓW ZABURZAJĄCYCH SYNTEZĘ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ**

W wyniku stosowania penicylin (szczególnie naturalnych, podawanych parenteralnie) może się rozwinąć reakcja nadwrażliwości, opisywana jako wysypka, pokrzywka, a nawet wstrząs anafilaktyczny. Ze względu na stosunkowo częste występowanie ostrych reakcji anafilaktycznych wśród ludzi (0,004–0,04%) zaleca się – przed podaniem naturalnych penicylin – wykonanie testu z benzylopenicyliną w ilości 100 IU i solą fizjologiczną, a przed podaniem penicyliny prokainowej (połączenie benzylopenicyliny z prokainą łagodzące ból podczas iniekcji) dodatkowo – z prokainą (podawanych śródskórnym, w przedramię, w objętości 0,1 ml) (Hryniewicz i Mészáros, 2002; Lagacé-Wiens i Rubinstein, 2012).



Konsekwencją przyjmowania penicylin może być również dysbakterioza, głównie po lekach szerokowidmowych. W wyniku dysbakteriozy dochodzi do nadkażeń grzybiczych i/lub bakteryjnych, np. nadmiernego namnażania się *Clostridioides difficile* – gatunku, który bywa przyczyną biegunki poantybiotykowej i/lub rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego (Lagacé-Wiens i Rubinstein, 2012; Sendzik i Stahlmann, 2006). Podczas stosowania terapii skojarzonej penicylinami i antybiotykami aminoglikozydowymi dochodzi do interakcji z doustnymi środkami antykoncepcyjnymi oraz antykoagulantami.

Do reakcji nadwrażliwości mogą się również przyczyniać cefalosporyny. W tym kontekście obserwuje się reakcje krzyżowe pomiędzy cefalosporynami i penicylinami. Oznacza to, że osobie, u której wystąpił wstrząs anafilaktyczny po penicylinach, nie należy podawać cefalosporyn (Hryniewicz i Mészáros, 2002; Lagacé-Wiens i Rubinstein, 2012). Dysbakteriozę i rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego szczególnie często łączy się z terapią cefalosporynami II i III generacji. Cefalosporyny są nefrotoksyczne. Natomiast w przypadku połączenia alkoholu z terapią skojarzoną cefalosporynami z aminoglikozydami lub z wankomycyną może wystąpić reakcja disulfiramowa.

Imipenem (jeden z karbapenemów) jest zawsze stosowany z cilastatyną. To kwas dikarboksylowy, który w postaci soli sodowej jest kompetycyjnym, odwracalnym i specyficznym inhibitorem dehydropeptydazy I, enzymu nerkowego metabolizującego i unieczynniającego imipenem. Cilastatyna nie wykazuje wewnątrzustrojowego działania przeciwbakteryjnego ani nie wpływa na przeciwbakteryjne właściwości imipenemu (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Monobaktamy dają słabą krzyżową reakcję alergiczną z innymi antybiotykami beta-laktamowymi. Należy podkreślić, że monobaktamy mogą być stosowane w przypadku reakcji anafilaktycznej na pozostałe antybiotyki beta-laktamowe (Lagacé-Wiens i Rubinstein, 2012).

Glikopeptydy i lipoglikopeptydy charakteryzują się ototoksycznością i nefrotoksycznością (Finch i Eliopoulos, 2005; Mattox i in., 2016). Wankomycyna może wzmacniać wydzielanie histaminy i wywoływać tzw. zespół czerwonego karku. Lipoglikopeptydy mogą powodować też rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego w drodze zaburzenia naturalnej mikrobioty jelit, a także wydłużenie odstępu QTc zapisu elektrokardiograficznego.

U pacjentów leczonych fosfomycyną mogą wystąpić zaburzenia ze strony układu pokarmowego oraz bóle i zawroty głowy; także senność.

#### DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE LEKÓW ZABURZAJĄCYCH FUNKCJE BŁON PLAZMATYCZNYCH

Polimyksyny to leki neurotoksyczne, nefrotoksyczne i ototoksyczne. Czasami są przyczyną nadwrażliwości tkanki skórnej i oskrzeli (Ordoe i in., 2015; Tsuji i in., 2019).

Lipopeptydy bardzo rzadko wywołują działania niepożądane, jeżeli jednak takie się pojawią, są to: eozynofilia, anafilaksja, zaburzenia mięśniowo-szkieletowe (niekorzystne oddziaływanie na tkankę łączną i kostną) (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

#### DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE LEKÓW ZABURZAJĄCYCH PROCES TRANSKRYPCJI

Działania niepożądane będące wynikiem stosowania terapii przeciwdrobnoustrojowej z użyciem ryfamycyn również odnotowuje się rzadko (Grosset i Leventis, 1983). Należą do nich: reakcja rzekomo-anafilaktyczna, zaburzenia ze strony układu pokarmowego, zaburzenia funkcji wątroby, zabarwienie śliny, łez, potu, moczu i kału na kolor pomarańczowy.

Fidaksomycyna, jedyna obecnie zarejestrowana lipiarmycyna, w marginalnym stopniu przedostaje się z jelit do krążenia systemowego, dlatego działania niepożądane związane są przede wszystkim z miejscowym działaniem antybiotyku w przewodzie pokarmowym. Mogą wystąpić mdłości, wymioty, bóle brzucha, biegunka, odbijanie i nadmierne oddawanie gazów (Fitzpatrick i in., 2022).

Do działań niepożądanych związanych z przyjmowaniem nitroksoliny należą głównie zaburzenia żołądkowo-jelitowe oraz zaczerwienienie i świąd skóry. Rzadko obserwuje się reakcje nadwrażliwości oraz zażółcenie powłok skórnych, włosów i paznokci spowodowane intensywnie żółtą barwą substancji czynnej (Naber i in., 2014).

## DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE LEKÓW ZABURZAJĄCYCH BIOSYNTEZĘ BIAŁEK

Aminoglikozydy to antybiotyki o działaniu ototoksycznym i neurotoksycznym (Hryniewicz i Mészáros, 2002; Prayle i in., 2010). Wchodzą w interakcje z penicylinami, cefalosporynami oraz wankomocyną i furosemidem.

Tetracykliny wywołują dysbakteriozę i wynikające z niej bakteryjne i/lub grzybicze nadkażenia oraz zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Wykazują hepatotoksyczność i fototoksyczność (podczas terapii tetracyklinami należy unikać nadmiernej ekspozycji na światło słoneczne). Są teratogenne. Tetracyklin nie stosuje się u dzieci do 12. roku życia ze względu na możliwość tworzenia kompleksów z jonami wapnia, co prowadzi do nieodwracalnych zmian w zębach (brązowawych przebarwień i hipoplazji szkliwa) oraz zaburzeń kostnienia (Hryniewicz i Mészáros, 2002; Sánchez i in., 2004). Możliwe są interakcje tetracyklin z innymi lekami (np. zmniejszanie efektywności doustnych środków antykoncepcyjnych).

Glicylocykliny najczęściej powodują nudności i wymioty oraz biegunkę (Doan i in., 2006). Wydłużają czas protrombinowy. Podobnie jak tetracykliny skutkują nieodwracalnymi zmianami w zębach i kościach.

Linezolid, jeden z najważniejszych przedstawicieli oksazolidynonów, uważany jest za lek dobrze tolerowany. Działania niepożądane występują u 20–25% pacjentów leczonych linezolidem i najczęściej dotyczą przewodu pokarmowego (biegunka, nudności, wymioty), mogą się też pojawić bóle i zawroty głowy, reakcje alergiczne, zaburzenia zmysłu smaku, bezsenność, gorączka (Dourous i in., 2015). U chorych przyjmujących linezolid dłużej niż 28 dni (tj. dłużej niż zalecany czas terapii tym lekiem) może dochodzić do zahamowania czynności szpiku kostnego, jak również rozwoju kwasicy mleczanowej, neuropatii obwodowych czy neuropatii nerwu wzrokowego.

Makrolidy powodują liczne działania niepożądane (gł. zaburzenia żołądkowo-jelitowe). Możliwe są interakcje z innymi lekami, np. wskutek inhibicyjnego działania erytromycyny i klarytromycyny wobec cytochromu P450 (w konsekwencji dochodzi do zahamowania metabolizmu leków, w którym to procesie uczestniczy cytochrom P450, np. statyn, werapamilu, benzodiazepin) (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Ketolidy bywają przyczyną nudności, biegunki, bólów i zawrotów głowy (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Linkozamidy u części pacjentów wywołują zaburzenia żołądkowo-jelitowe, bywają też przyczyną rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego na drodze zaburzenia naturalnej mikrobioty jelit (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Streptograminy mogą powodować zaburzenia żołądkowo-jelitowe, a także zapalenie zakrzepowe żył (Balbi, 2004). Leki z tej grupy są silnymi inhibitorami cytochromu P450, przez co mogą wpływać na działanie innych leków metabolizowanych przez ten enzym w wątrobie, np. statyn, sartanów, benzodiazepin.

W wyniku terapii chloramfenikolem pacjent może cierpieć na zaburzenia żołądkowo-jelitowe i zaburzenia o charakterze hematologicznym (Hryniewicz i Mészáros, 2002). Przy nieodpowiednim dawkowaniu chloramfenikolu, głównie u noworodków, może rozwinąć się tzw. zespół szarego dziecka, z nasilającą się sinicą, rozdęciem brzucha, wymiotami i niewydolnością krążenia.

Kwas fusydowy jest hepatotoksyczny, powoduje też zaburzenia żołądkowo-jelitowe, wysypki, zapalenie żył i hipokalcemię (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Mupirocyna może wywoływać świąd i podrażnienia skóry oraz ogólne reakcje nadwrażliwości (bardzo rzadko) (Hryniewicz i Mészáros, 2002).

## DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE LEKÓW ZABURZAJĄCYCH REPLIKACJĘ I UTRZYMANIE STRUKTURY DNA

Chinolony bywają przyczyną zaburzeń ze strony układu pokarmowego (nudności, wymiotów, biegunki, rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego – następstwa niekorzystnych oddziaływań na mikrobiotę jelit), układu nerwowego (bólów głowy, drgawek, zaburzeń snu, zaburzeń świadomości i halucynacji – rzadko), reakcji alergicznych (wysypki, świądu, gorączki, pokrzywki) (Stahlmann i Lode, 2010). Mogą też zaburzać wzrost chrząstki stawowej, dlatego zalecenia odnośnie do

stosowania chinolonów dotyczą osób powyżej 18. roku życia. Używanie chinolonów i fluorochinolonów może skutkować poważnymi odległymi działaniami niepożądanymi, ujawniającymi się po miesiącach, a nawet latach, prowadzącymi nawet do kalectwa (zapalenie ścięgna, zapalenie mięśnia sercowego, neuropatie, zaburzenia funkcjonowania zmysłów) (EMA, 2018).

Nitroimidazole są neurotoksyczne (powodują senność, zawroty głowy, neuropatie) (Hryniewicz i Mészáros, 2002). Możliwe jest wystąpienie reakcji disulfiramowej w przypadku połączenia ich z alkoholem.

#### DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE LEKÓW ZABURZAJĄCYCH SYNTEZĘ KWASU FOLIOWEGO I INNE SZLAKI METABOLIZMU KOMÓRKOWEGO

Sulfonamidy mogą być przyczyną krystalurii, reakcji nadwrażliwości, zespołu Stevensa–Johnsona, toksycznej nekrolizy naskórka (tzw. zespół Lyella), anemii hemolitycznej, fototoksyczności, żółtaczki jąder podkorowych u noworodków (z tego względu leki są niewskazane do stosowania u noworodków i kobiet ciężarnych, szczególnie w III trymestrze ciąży). Sulfonamidy wchodzi w interakcje z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, a także z warfaryną, acenokumarolem, doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi i pochodnymi sulfonilomocznika (Hryniewicz i Mészáros, 2002; Slatore i Tilles, 2004).

Nitrofurany powodują bóle i zawroty głowy oraz zaburzenia żołądkowo-jelitowe (McCalla, 1977). Mają negatywny wpływ na czynność jąder (u mężczyzn leczonych nitrofuranami obserwuje się zmiany morfologii plemników i ich ruchliwości).

#### WPŁYW LEKÓW PRZECIWBAKTERYJNYCH NA MIKROBIOTĘ JELIT

Do leków o silnym destrukcyjnym wpływie na mikrobiotę jelit należą: fluorochinolony, cefalosporyny II i III generacji, klindamycyna, ampicylina, amoksycylina, penicyliny o szerokim spektrum działania, także w połączeniu z inhibitorami beta-laktamaz (oprócz tikarcyliny z kwasem klawulanowym i piperacyliny z tazobaktamem) (Hryniewicz i in., 2020; Lange i in., 2016; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Do leków o umiarkowanym destrukcyjnym wpływie na mikrobiotę jelit zaliczamy: makrolidy, trimetoprim z sulfametoksazolem, pozostałe sulfonamidy i penicyliny inne niż te, które wobec mikrobioty jelit są silnie destrukcyjne (Hryniewicz i in., 2020; Lange i in., 2016; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Nieznacznym wpływem na mikrobiotę jelit wykazują: aminoglikozydy, glikopeptydy, metronidazol, rifampicyna, chloramfenikol, tetracyklina, tigecyklina, daptomycyna, karbapenemy oraz cefalosporyny I i IV generacji (Hryniewicz i in., 2020; Lange i in., 2016; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Jednym ze sposobów utrzymania mikrobioty jelit w stanie równowagi jest przyjmowanie probiotyków, czyli precyzyjnie opisanych pod względem taksonomicznym, niewirulentnych (ang. *generally recognized as safe*, GRAS), żywych szczepów mikroorganizmów (najczęściej bakterii, ale także drożdżaków), które – dostarczane do organizmu człowieka regularnie i w odpowiednich ilościach – wywierają korzystny wpływ na jego zdrowie (Denys, 2015; Szajewska, 2021; Tokarz-Deptuła i Deptuła, 2017). Probiotyki pochodzą najczęściej z produktów spożywczych (fermentowanych oraz niefermentowanych, zwykle nabiału), a także z ludzkiego mleka oraz stolca, pobieranych od młodych zdrowych dawców. Kliniczna aktywność probiotyków musi być dokładnie udokumentowana, a szczepy probiotyczne winna cechować stabilność fenotypowa i genetyczna (nie mogą być one źródłem łatwo przekazywanych pomiędzy drobnoustrojami genów kodujących czynniki chorobotwórczości czy lekooporności). Działania mające na celu stymulację rozwoju pożytecznych mikroorganizmów w organizmie gospodarza, hamujących aktywność chorobotwórczych patogenów, określa się terminem probiozy. Probiotyki stosuje się w celach profilaktycznych i terapeutycznych, znajdują się one w suplementach diety, w żywności funkcjonalnej i w preparatach leczniczych. Technika ich produkcji (z wykorzystaniem np. liofilizacji, suszenia rozpyłowego lub zamrażania) i sposób

przechowywania nie mogą mieć niekorzystnego wpływu na żywotność szczepów probiotycznych i ich właściwości biologiczne (Sornplang i Piyadeatsoontorn, 2016).

Probiotyki mają zdolność docierania do swoistych dla siebie receptorów w nienaruszonej postaci, jak również do szybkiej kolonizacji tkanek docelowych (ważną rolę w tym procesie odgrywają fimbrie adhezyjne, śluz, glikokaliks i otoczki szczepów bakteryjnych) (Denys, 2015). Gęstość doustnego preparatu probiotycznego przed podaniem powinna być porównywalna z gęstością, jaką uzyskuje się po osiągnięciu nabłonka jelitowego, co będzie świadczyć o jego oporności na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowych jamy ustnej, soku żołądkowego i kwasów żółciowych (w tym celu stosuje się techniki mikrokapsulacji lub mikrogranulacji, wykorzystujące np. osłonki alginianowe, gumowe, wykonane z pochodnych celulozy czy skrobi).

Działanie probiotyczne wykazują bakterie kwasu mlekowego (ang. *Lactic acid bacteria*, LAB), głównie z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* (Denys, 2015; Szajewska, 2021; Zhou i in., 2019). LAB pozyskują energię niezbędną do przemian metabolicznych na drodze beztlenowej fermentacji mlekowej cukrów. Właściwości probiotyczne mają także szczep *Escherichia coli* Nissle 1917 oraz drożdżaki z rodzaju *Saccharomyces*.

Poza probiotykami istotne uzupełnienie diety stanowią prebiotyki, czyli składniki spożywanych przez człowieka produktów spożywczych (naturalnych bądź przetworzonych), które w sposób wybiórczy pobudzają metabolizm mikroorganizmów układu pokarmowego i wpływają korzystnie na skład oraz aktywność naturalnej mikrobioty tej lokalizacji anatomicznej, a tym samym na stan zdrowia konsumenta. Prebiotyk, ze względu na swą strukturę chemiczną, nie ulega procesowi trawienia i wchłaniania w jelicie cienkim, natomiast w jelicie grubym odbywa się jego fermentacja – jest selektywnym substratem dla określonego gatunku (lub grupy gatunków) drobnoustrojów okrężnicy. Do najważniejszych związków prebiotycznych, wchodzących w skład tzw. błonnika pokarmowego, zalicza się: fruktooligosacharydy, galaktooligosacharydy, ksylooligosacharydy, oligosacharydy sojowe, inuliny, pektyny, odporne skrobie i nieskrobiowe poliwęglowodany (np. celulozę i hemicelulozę, gumy) (Denys, 2015; Zhou i in., 2019). Synbiotyk natomiast to połączenie probiotyku z prebiotykiem (podawane są one razem).

Substancje wydzielane przez wchodzące w skład mikrobioty drobnoustroje oraz związki uwalniane podczas lizy tych mikroorganizmów określa się jako postbiotyki. Termin odnosi się zarówno do składników odżywczych, takich jak witaminy z grup B i K czy aminokwasy, jak również do peptydów przeciwdrobnoustrojowych spowalniających wzrost potencjalnych patogenów. Inne substancje postbiotyczne, zwane krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi, wspomagają rozwój korzystnych dla zdrowia bakterii i grzybów (Żółkiewicz i in., 2020).

W literaturze fachowej pojawia się coraz więcej doniesień na temat psychobiotyków, czyli probiotycznych mikroorganizmów, które mogą mieć korzystny wpływ na zdrowie psychiczne człowieka (Bermúdez-Humarán i in., 2019; Cheng i in., 2019; Sarkar i in., 2016).

Aktualne międzynarodowe wytyczne zalecają probiotykoterapię w celu zapobieżenia zakażeniu *Clostridioides difficile*, zapaleniu zbiornika jelitowego (ang. *pouchitis*) oraz martwiczemu zapaleniu jelit u wcześniaków (Kelly i in., 2021). Brak jest jednoznacznych dowodów na korzystny wpływ probiotyków przyjmowanych podczas antybiotykoterapii na mikrobiotę jelit lub w celu łagodzenia objawów zespołu jelita drażliwego (ang. *irritable bowel syndrome*, IBS) (Szajewska, 2021), jednakże dostępne są doniesienia wskazujące na ich pozytywne działanie u pacjentów z IBS (Thursby i Juge, 2017).

Większość probiotyków sprzedaje się jako suplementy diety, co nie gwarantuje ich bezpieczeństwa. Raport Naczelnej Izby Kontroli (NIK) ujawnił, że liczne dostępne na rynku produkty, zarejestrowane jako suplementy diety, nie są poddawane należytej kontroli jakości (NIK, 2017). W związku z tym w przypadku konieczności przeprowadzenia probiotykoterapii należy używać preparatów zarejestrowanych jako leki lub probiotyków naturalnych zawartych w produktach żywnościowych, takich jak kiszonki i jogurty. Co więcej, w literaturze pojawiają się opisy przypadków pacjentów za-

infekowanych drobnoustrojami probiotycznymi, dlatego decyzja o ich stosowaniu powinna być pojęta z taką samą starannością jak w przypadku leków konwencjonalnych (Tom i in., 2021; Zawistowska-Rojek i Tyski, 2018).

## Bibliografia

- Alam M.S., Rana K., Bhardwaj S., Kaliaperumal J., Hussain M.S., Mittal A. 2019. Role of nitrofurantoin in the management of urinary tract infection – a systematic review. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences* 8(50), str. 3805–3812. DOI: [10.14260/jemds/2019/824](https://doi.org/10.14260/jemds/2019/824).
- Balbi H.J. 2004. Chloramphenicol: a review. *Pediatrics in Review* 25(8), str. 284–288. DOI: [10.1542/pir.25-8-284](https://doi.org/10.1542/pir.25-8-284).
- Balfour H.H. Jr. 1999. Antiviral drugs. *New England Journal of Medicine* 340(16), str. 1255–1268. DOI: [10.1056/NEJM199904223401608](https://doi.org/10.1056/NEJM199904223401608).
- Bassetti M., Righi E., Viscoli C. 2008. Novel beta-lactam antibiotics and inhibitor combinations. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17(3), str. 285–296. DOI: [10.1517/13543784.17.3.285](https://doi.org/10.1517/13543784.17.3.285).
- Bazan J.A., Martin S.I., Kaye K.M. 2009. Newer beta-lactam antibiotics: doripenem, ceftobiprole, ceftaroline, and cefepime. *Infectious Disease Clinics of North America* 23(4), str. 983–996. DOI: [10.1016/j.idc.2009.06.007](https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.007).
- Bermúdez-Humarán L.G., Salinas E., Ortiz G.G., Ramirez-Jirano L.J., Morales J.A., Bitzer-Quintero O.K. 2019. From probiotics to psychobiotics: live beneficial bacteria which act on the brain-gut axis. *Nutrients* 11(4), nr art. 890. DOI: [10.3390/nu11040890](https://doi.org/10.3390/nu11040890).
- Bush K., Bradford P.A. 2016. Beta-lactams and beta-lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(8), a025247. DOI: [10.1101/cshperspect.a025247](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247).
- Bush K., Macielag M.J. 2010. New beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 20(10), str. 1277–1293. DOI: [10.1517/13543776.2010.515588](https://doi.org/10.1517/13543776.2010.515588).
- Bush N.G., Diez-Santos I., Abbott L.R., Maxwell A. 2020. Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules* 25(23), nr art. 5662. DOI: [10.3390/molecules25235662](https://doi.org/10.3390/molecules25235662).
- Capela R., Moreira R., Lopes F. 2019. An overview of drug resistance in protozoal diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 20(22), nr art. 5748. DOI: [10.3390/ijms20225748](https://doi.org/10.3390/ijms20225748).
- Chen L.F., Kaye D. 2009. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Infectious Disease Clinics of North America* 23(4), str. 1053–1075. DOI: [10.1016/j.idc.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.004).
- Cheng L.H., Liu Y.W., Wu C.C., Wang S., Tsai Y.C. 2019. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Journal of Food and Drug Analysis* 27(3), str. 632–648. DOI: [10.1016/j.jfda.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.002).
- Denys A. 2015. *Zagrożenia zdrowia publicznego. Zdrowie człowieka a środowisko, część 2*, wyd. 1. Wolters Kluwer, Warszawa.
- Doan T.L., Fung H.B., Mehta D., Riska P.F. 2006. Tigecycline: a glycolcycine antimicrobial agent. *Clinical Therapeutics* 28(8), str. 1079–1106. DOI: [10.1016/j.clinthera.2006.08.011](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.08.011).
- Douros A., Grabowski K., Stahlmann R. 2015. Drug-drug interactions and safety of linezolid, tedizolid, and other oxazolidinones. *Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology* 11(12), str. 1849–1859. DOI: [10.1517/17425255.2015.1098617](https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1098617).
- Dzierżanowska D. 2019. *Przewodnik antybiotykoterapii szpitalnej*, wyd. 2. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała.
- Dzierżanowska-Fangrat K. 2022. *Przewodnik antybiotykoterapii 2022*, wyd. 27. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała.
- Dziewirz P., Lemańska M. 2018. Pozycja nitroksoliny w leczeniu niepowikłanych zakażeń układu moczowego u dorosłych. *Zakażenia XXI wieku* 1(4), str. 143–147.
- EMA (European Medicines Agency). 2018. Disabling and potentially permanent side effects lead to suspension or restrictions of quinolone and fluoroquinolone antibiotics. Dostępne online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/disabling-potentially-permanent-side-effects-lead-suspension-restrictions-quinolone-fluoroquinolone> (dostęp: 29.10.2022).

- EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2022. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. Dostępne online: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf) (dostęp: 02.11.2022).
- Finch R.G., Eliopoulos G.M. 2005. Safety and efficacy of glycopeptide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(Suppl 2), str. ii5–ii13. DOI: [10.1093/jac/dki004](https://doi.org/10.1093/jac/dki004).
- Fitzpatrick F., Safdar N., van Prehn J., Tschudin-Sutter S. 2022. How can patients with *Clostridioides difficile* infection on concomitant antibiotic treatment be best managed? *Lancet Infectious Diseases* 22, str. e336–e340. DOI: [10.1016/S1473-3099\(22\)00274-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00274-2).
- Grosset J., Leventis S. 1983. Adverse effects of rifampin. *Reviews of Infectious Diseases* 5(Suppl 3), str. S440–S450. DOI: [10.1093/clinids/5.supplement\\_3.s440](https://doi.org/10.1093/clinids/5.supplement_3.s440).
- Hryniewicz W., Mészáros J. 2002. *Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Hryniewicz W., Ozorowski T., Żukowska A. 2020. Szpitalna lista antybiotyków – 2020. Propozycja kierowana do szpitali. Dostępne online: [http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/2020/09/rekomendacje-antybiotyki\\_2020.09.02.pdf](http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/2020/09/rekomendacje-antybiotyki_2020.09.02.pdf) (dostęp: 15.09.2021).
- Jeya M., Moon H.J., Lee K.M., Kim I.W., Lee J.K. 2011. Glycopeptide antibiotics and their novel semi-synthetic derivatives. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12(8), str. 1194–11204. DOI: [10.2174/138920111796117382](https://doi.org/10.2174/138920111796117382).
- Karas J.A., Carter G.P., Howden B.P., Turner A.M., Paulin O.K.A., Swarbrick J.D., Baker M.A., Li J., Velkov T. 2020. Structure-activity relationships of daptomycin lipopeptides. *Journal of Medicinal Chemistry* 63(22), str. 13266–13290. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.0c00780](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00780).
- Kelly C., Fischer M., Allegretti J., LaPlante K., Stewart D., Limketkai B., Stollman N. 2021. ACG clinical guidelines: prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridioides difficile* infections. *American Journal of Gastroenterology* 116(6), str. 1124–1147. DOI: [10.14309/ajg.0000000000001278](https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001278).
- Lagacé-Wiens P., Rubinstein E. 2012. Adverse reactions to beta-lactam antimicrobials. *Expert Opinion on Drug Safety* 11(3), str. 381–399. DOI: [10.1517/14740338.2012.643866](https://doi.org/10.1517/14740338.2012.643866).
- Lange K., Buerger M., Stallmach A., Bruns T. 2016. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Digestive Diseases* 34(3), str. 260–268. DOI: [10.1159/000443360](https://doi.org/10.1159/000443360).
- Li Z., Velkov T. 2019. Polymyxins: mode of action. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1145, str. 37–54. DOI: [10.1007/978-3-030-16373-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_4).
- Louie T.J., Emery J., Krulicki W., Byrne B., Mah M. 2009. OPT-80 eliminates *Clostridium difficile* and is sparing of bacteroides species during treatment of *C. difficile* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(1), str. 261–263. DOI: [10.1128/AAC.01443-07](https://doi.org/10.1128/AAC.01443-07).
- Mast Y., Wohlleben W. 2014. Streptogramins – two are better than one! *International Journal of Medical Microbiology* 304(1), str. 44–50. DOI: [10.1016/j.ijmm.2013.08.008](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.008).
- Mattox J., Belliveau P., Durand C. 2016. Oritavancin: a novel lipoglycopeptide. *Consultant Pharmacist* 31(2), str. 86–95. DOI: [10.4140/TCP.n.2016.86](https://doi.org/10.4140/TCP.n.2016.86).
- McCalla D.R. 1977. Biological effects of nitrofurans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 3(5), str. 517–520. DOI: [10.1093/jac/3.5.517](https://doi.org/10.1093/jac/3.5.517).
- Mitrović A., Kos J. 2019. Nitroxoline: repurposing its antimicrobial to antitumor application. *Acta Biochimica Polonica* 66(4), str. 521–531. DOI: [10.18388/abp.2019\\_2904](https://doi.org/10.18388/abp.2019_2904).
- NIK (Najwyższa Izba Kontroli). 2017. Dopuszczenie do obrotu suplementów diety. Dostępne online: <https://www.nik.gov.pl/plik/id,13031,vp,15443.pdf> (dostęp: 29.10.2022).
- Naber K.G., Niggemann H., Stein G., Stein G. 2014. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infectious Diseases* 27(14), nr art. 628. DOI: [10.1186/s12879-014-0628-7](https://doi.org/10.1186/s12879-014-0628-7).
- Nailor M.D., Sobel J.D. 2009. Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, dalbavancin, and telavancin. *Infectious Disease Clinics of North America* 23(4), str. 965–982. DOI: [10.1016/j.idc.2009.06.010](https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.010).
- Nováková L., Pavlík J., Chrenková L., Martinec O., Červený L. 2018a. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials-Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147, str. 400–416. DOI: [10.1016/j.jpba.2017.06.071](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.071).

- Nováková L., Pavlík J., Chrenková L., Martinec O., Červený L. 2018b. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials – Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147, str. 378–399. DOI: [10.1016/j.jpba.2017.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.003).
- Ordooei Javan A., Shokouhi S., Sahraei Z. 2015. A review on colistin nephrotoxicity. *European Journal of Clinical Pharmacology* 71(7), str. 801–810. DOI: [10.1007/s00228-015-1865-4](https://doi.org/10.1007/s00228-015-1865-4).
- Pimentel M. 2009. Review of rifaximin as treatment for SIBO and IBS. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18(3), str. 349–358. DOI: [10.1517/13543780902780175](https://doi.org/10.1517/13543780902780175).
- Poole C.L., Kimberlin D.W. 2017. Antiviral drugs in newborn and children. *Pediatric Clinics of North America* 64(6), str. 1403–1415. DOI: [10.1016/j.pcl.2017.08.014](https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.08.014).
- Prayle A., Watson A., Fortnum H., Smyth A. 2010. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax* 65(7), str. 654–658. DOI: [10.1136/thx.2009.131532](https://doi.org/10.1136/thx.2009.131532).
- Robbins N., Wright G.D., Cowen L.E. 2016. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. *Microbiology Spectrum* 4(5). DOI: [10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016).
- Rolinson G.N. 1986. Beta-lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 17(1), str. 5–36. DOI: [10.1093/jac/17.1.5](https://doi.org/10.1093/jac/17.1.5).
- Sánchez A.R., Rogers R.S. 3rd, Sheridan P.J. 2004. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International Journal of Dermatology* 43(10), str. 709–715. DOI: [10.1111/j.1365-4632.2004.02108.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02108.x).
- Sarkar A., Lehto S.M., Harty S., Dinan T.G., Cryan J.F., Burnet P.W.J. 2016. Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends in Neurosciences* 39(11), str. 763–781. DOI: [10.1016/j.tins.2016.09.002](https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002).
- Sendzik J., Stahlmann R. 2006. Opposition to Ehrlich's paradigm of selective toxicity. Adverse effects of beta lactam antibiotics. *Pharmazie in Unserer Zeit* 35(5), str. 432–437. DOI: [10.1002/pauz.200600190](https://doi.org/10.1002/pauz.200600190).
- Shan L., Wenling Q., Mauro P., Stefano B. 2020. Antibacterial agents targeting the bacterial cell wall. *Current Medicinal Chemistry* 27(17), str. 2902–2926. DOI: [10.2174/0929867327666200128103653](https://doi.org/10.2174/0929867327666200128103653).
- Shaw K.J., Barbachyn M.R. 2011. The oxazolidinones: past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1241, str. 48–70. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2011.06330.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06330.x).
- Shayto R.H., Abou Mrad R., Sharara A.I. 2016. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World Journal of Gastroenterology* 22(29), str. 6638–6651. DOI: [10.3748/wjg.v22.i29.6638](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i29.6638).
- Silver L.L. 2017. Fosfomycin: mechanism and resistance. *Cold Spring Harb Perspectives in Medicine* 7(2), nr art. a025262. DOI: [10.1101/cshperspect.a025262](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025262).
- Slatore C.G., Tilles S.A. 2004. Sulfonamide hypersensitivity. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 24(3), str. 477–490. DOI: [10.1016/j.iac.2004.03.011](https://doi.org/10.1016/j.iac.2004.03.011).
- Smith C.L., Powell K.R. 2000. Review of the sulfonamides and trimethoprim. *Pediatrics in Review* 21(11), str. 368–371.
- Sornplang P., Piyadeatsoontorn S. 2016. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology* 58, str. 26. DOI: [10.1186/s40781-01600108-2](https://doi.org/10.1186/s40781-01600108-2).
- Spížek J., Řezanka T. 2017. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology* 133, str. 20–28. DOI: [10.1016/j.bcp.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001).
- Srivastava A., Talaue M., Liu S., Degen D., Ebricht R.Y., Sineva E., Chakraborty A., Druzhinin S.Y., Chatterjee S., Mukhopadhyay J., Ebricht Y.W., Zozula A., Shen J., Sengupta S., Niedfeldt R.R., Xin C., Kaneko T., Irschik H., Jansen R., Donadio S., Connel N., Ebricht R.H. 2011. New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: 'switch region'. *Current Opinion in Microbiology* 14(5), str. 532–543. DOI: [10.1016/j.mib.2011.07.030](https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.030).
- Szajewska H. 2021. Rola probiotyków w profilaktyce i leczeniu chorób przewodu pokarmowego według aktualnych wytycznych. *Medycyna Praktyczna* 1, str. 44–53.
- Szczeklik A., Gajewski P. 2022. *Interna Szczeklika 2022*, wyd. 13. Medycyna Praktyczna, Polski Instytut Evidence Based Medicine, Kraków.
- Tokarz-Deptuła B., Deptuła W. 2017. Probiotyki a układ odpornościowy przewodu pokarmowego ssaków. *Postępy Mikrobiologii* 56(2), str. 157–162.
- Tom F.S., Tucker K.J., McCracken C.M., McGregor J.C., Gore S.J. 2021. Infectious complications of probiotic use: a matched case-control study. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 8, str. 1–3. DOI: [10.1017/ice.2021.261](https://doi.org/10.1017/ice.2021.261).

- Tsuji B.T., Pogue J.M., Zavascki A.P., Paul M., Daikos G.L., Forrest A., Giacobbe D.R., Viscoli C., Giamarellou H., Karaiskos I., Kaye D., Tam V.H., Thamlikitkul V., Wunderink R.G., Li J., Nation R.L., Kaye K.S. 2019. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy* 39(1), str. 10–39. DOI: [10.1002/phar.2209](https://doi.org/10.1002/phar.2209).
- Tucaliuc A., Blaga A.C., Galaction A.I., Cascaval D. 2019. Mupirocin: applications and production. *Biotechnology Letters* 41(4–5), str. 495–502. DOI: [10.1007/s10529-019-02670-w](https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w).
- Turnidge J. 1999. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12(Suppl 2), str. S23–S34. DOI: [10.1016/s0924-8579\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(98)00071-5).
- Vázquez-Laslop N., Mankin A.S. 2018. How macrolide antibiotics work. *Trends in Biochemical Sciences* 43(9), str. 668–684. DOI: [10.1016/j.tibs.2018.06.011](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011).
- Vincent S., Bronze M.S., Cooper T.W., Greenfield R.A. 2007. Part X. Tetracycline and glycylicycline antimicrobials. *Journal of Oklahoma State Medical Association* 100(6), str. 241–247.
- Wiltink E.H., Janknegt R. 1991. Antiviral drugs. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 13(2), str. 58–69. DOI: [10.1007/BF01974982](https://doi.org/10.1007/BF01974982).
- Zawistowska-Rojek A., Tyski S. 2018. Are probiotic really safe for humans? *Polish Journal of Microbiology* 67(3), str. 251–258. DOI: [10.21307/pjm-2018-044](https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044).
- Zhanel G.G., Walters M., Noreddin A., Vercaigne L.M., Wierzbowski A., Embil J.M., Gin A.S., Douthwaite S., Hoban D.J. 2002. The ketolidides: a critical review. *Drugs* 62(12), str. 1771–1804. DOI: [10.2165/00003495-200262120-00006](https://doi.org/10.2165/00003495-200262120-00006).
- Zhang J., Ba Y., Wang S., Yang H., Hou X., Xu Z. 2019. Nitroimidazole-containing compounds and their antibacterial and antitubercular activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 179, str. 376–388. DOI: [10.1016/j.ejmech.2019.06.068](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.068).
- Zhou Y., Cui Y., Qu X. 2019. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: a review. *Carbohydrate Polymers* 207, str. 317–332. DOI: [10.1016/j.carbpol.2018.11.093](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093).
- Żółkiewicz J., Marzec A., Ruszczyński M., Feleszko W. 2020. Postbiotics – a step beyond pre- and probiotics. *Nutrients* 12(8), str. 2189. DOI: [10.3390/nu12082189](https://doi.org/10.3390/nu12082189).
- Żukowska A., Hryniewicz W. 2020. Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki antybiotykowej zakażeń w szpitalu – 2020. Materiał przeznaczony dla komitetów terapeutycznych i zespołów ds. antybiotykoterapii. Dostępne online: [http://www.ses.edu.pl/files/rekomendacje-diagnostyki-terapii\\_2021.03.02.pdf](http://www.ses.edu.pl/files/rekomendacje-diagnostyki-terapii_2021.03.02.pdf) (dostęp: 15.09.2021).



# ROZDZIAŁ VI. OPORNOŚĆ BAKTERII NA LEKI PRZECIWBAKTERYJNE

CHAPTER VI.  
BACTERIAL DRUG RESISTANCE



## Wprowadzenie

Zdecydowanie najczęstszym i najpoważniejszym błędem w leczeniu za pomocą antybiotyków lub chemioterapeutyków jest ich nadużywanie, czyli wdrażanie tego typu terapii przy braku wskazań medycznych (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022). W ciągu ostatniego dziesięciolecia problem zmniejszonej wrażliwości i/lub braku wrażliwości drobnoustrojów na leki przeciwbakteryjne stał się na tyle istotny, że Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) wskazała zjawisko lekooporności przeciwdrobnoustrojowej jako jedno z najpoważniejszych globalnych zagrożeń dla zdrowia publicznego (Narodowy Program Ochrony Antybiotyków – Informacje o Europejskim Dniu Wiedzy o Antybiotykach).

Pierwszym, a zarazem kluczowym błędem przy podejmowaniu decyzji dotyczącej wprowadzenia terapii przeciwbakteryjnej jest niewłaściwe ustalenie czynnika etiologicznego. Bezasadne stosowanie antybiotyków w zakażeniach wirusowych również prowadzi do selekcji lekoopornych szczepów bakteryjnych, także wśród drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobioty błon śluzowych i skóry, które mogą następnie stać się źródłem genów oporności na leki dla potencjalnych patogenów. Z kolei oporność mikroorganizmu na zastosowany antybiotyk może być przyczyną braku możliwości jego eradykacji, a tym samym – prowadzić do rozprzestrzeniania się szczepów opornych w środowisku i do kolonizacji nimi osób z otoczenia. W przypadku pacjentów szpitalnych wydłużeniu ulega zwykle czas hospitalizacji przy jednocześnie zwiększonym ryzyku rozwoju powikłań układowych. Poważne konsekwencje pociąga za sobą również nieodpowiedni dobór terapii, czyli np. stosowanie antybiotyków lub chemioterapeutyków niepenetrujących do miejsca zakażenia, w nieprawidłowych dawkach lub w niewłaściwych odstępach czasowych pomiędzy dawkami (Dzierżanowska, 2019).

Problem narastającej lekooporności bakteryjnej jest wyzwaniem dla szeregu instytucji i jedynie odpowiednie zapisy aktów prawnych, rekomendacji, standardów i procedur oraz ścisła współpraca mikrobiologów, lekarzy i farmakologów mogą to zmienić.

W medycynie stosuje się różne formy terapii przeciwbakteryjnej, m.in. terapię empiryczną i celowaną, terapię deeskalacyjną, terapię sekwencyjną (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022; Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Terapia empiryczna to leczenie przeciwdrobnoustrojowe włączone bez wyniku badania bakteriologicznego, m.in. na podstawie znajomości lokalnej sytuacji epidemiologicznej czy wykonanego bezpośrednio z materiału klinicznego preparatu barwionego metodą Grama. Terapia celowana to leczenie włączone na podstawie wyniku badania bakteriologicznego.

Terapia deeskalacyjna polega na zastosowaniu, na początkowym etapie infekcji, leku przeciwbakteryjnego o szerokim spektrum aktywności, a następnie – po uzyskaniu wyników badań bakteriologicznych – zawężeniu zakresu działania stosowanych leków do czynnika etiologicznego zakażenia.

Terapia sekwencyjna to leczenie najpierw drogą pozajelitową, które później – w określonych sytuacjach – jest kontynuowane doustnie (leczenie *per os* obarczone jest zwykle mniejszym ryzykiem wystąpienia różnego rodzaju komplikacji, jest też bardziej uzasadnione ekonomicznie).

W medycynie stosuje się również profilaktykę antybiotykową, na którą składają się: antybiotykowa profilaktyka okołozabiegowa, podanie leku przeciwbakteryjnego po kontakcie z pacjentem cierpiącym na chorobę zakaźną (np. krztusiec czy meningokokowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych) lub przy skłonnościach do nawrotów infekcji (jak np. nawracające zakażenia dróg moczowych), a także podanie antybiotyku osobom z grup ryzyka rozwoju zakażeń (np. chorym z neutropenią, pacjentom z chorobami serca czy w celu zapobieżenia infekcyjnemu zapaleniu wsierdza).

Współczesna antybiotykoterapia boryka się z wieloma problemami, do najważniejszych zaliczają się: mnogość znanych czynników infekcyjnych i pojawianie się wciąż nowych – odpowiedzialnych za zakażenia – mikroorganizmów, rozprzestrzenianie się wśród drobnoustrojów znanych już mechanizmów lekooporności, jak również pojawianie się nowych, a w konsekwencji – coraz mniej-

szą liczbą skutecznych leków przeciwbakteryjnych, o dobrych parametrach efektywności i bezpieczeństwa. Dlatego odpowiedzialny lekarz powinien kierować się następującymi zasadami racjonalnej antybiotykoterapii:

- antybiotyki należy stosować tak często, jak to konieczne, i tak rzadko, jak to tylko możliwe,
- muszą zaistnieć uzasadnione wskazania do zastosowania antybiotyku,
- spektrum działania zastosowanego antybiotyku winno być tak wąskie, jak to możliwe, i tak szerokie, jak to konieczne,
- czas trwania leczenia winien być tak długi, jak to konieczne, i tak krótki, jak to możliwe (Dzierżanowska, 2019; Szczeklik i Gajewski, 2022; Hryniewicz i Mészáros, 2002).

Podstawowe informacje na temat leków przeciwbakteryjnych zawarto w poprzednim rozdziale monografii (Rozdział V: Metody zwalczania bakterii – leki przeciwbakteryjne). W rozdziale bieżącym omówiono genetyczne podstawy lekooporności bakterii, wyjaśniono różnicę pomiędzy naturalną i nabytą opornością na leki przeciwdrobnoustrojowe i ich znaczenie dla przebiegu procesu leczenia, zdefiniowano pojęcie wielolekooporności bakteryjnej, podano przykłady najważniejszych mechanizmów oporności bakterii na leki z różnych grup chemicznych, przywołano podstawowe wskaźniki oceny skuteczności terapii antybakteryjnej.

## **Genetyczne podstawy lekooporności bakterii**

U genetycznych podstaw zmienności prokariotów w zakresie lekooporności leżą mutacje spontaniczne, mutacje indukowane oraz rekombinacje (Creager, 2007; Durão i in., 2018; Woodford i Ellington, 2007).

Mutacje spontaniczne zachodzą samorzutnie, przypadkowo, niezależnie od obecności leku w środowisku. Są to błędy pojawiające się podczas replikacji bakteryjnego DNA, które mogą się okazać korzystne dla komórek prokariotycznych. Zmiana w genomie bakterii, skutkująca opornością na lek przeciwdrobnoustrojowy, może być też indukowana obecnością tego leku w otoczeniu drobnoustrojów. Utrwalenie mutacji odbywa się na drodze selekcji. Komórki bakteryjne, które nabyły przewagę selekcyjną w określonym środowisku (w tym przypadku – zyskały cechę lekooporności), przeżywają i dają początek nowej, lekoopornej populacji bakteryjnej, sukcesywnie powiększającej swą liczebność i po pewnym czasie dominującej.

Geny oporności na leki mają w komórkach bakteryjnych różną lokalizację. Może to być oczywiście chromosom bakteryjny, ale są to również mobilne elementy genomu bakterii, jak plazmidy, transpozony, integrony (Creager, 2007; Durão i in., 2018).

Przenoszenie genów lekooporności odbywa się u bakterii na drodze pionowej (wertykalnej), czyli z komórki macierzystej do komórki potomnej, lub na drodze poziomej (horyzontalnej), czyli z jednej komórki bakteryjnej do innej, nie będącej komórką potomną (również innego gatunku lub rodzaju, jednak w obrębie spokrewnionych grup taksonomicznych drobnoustrojów).

W przypadku transmisji horyzontalnej transfer bakteryjnych genów oporności na leki odbywa się dzięki trzem procesom – koniugacji, transdukcji i transformacji – odpowiedzialnym za zmienność rekombinacyjną bakterii, utrwalaną również poprzez selekcję.

Spośród wyżej wymienionych największe znaczenie w kontekście szerzenia się lekooporności odgrywa koniugacja. Jest to wymiana materiału genetycznego pomiędzy dwiema komórkami bakteryjnymi, z których jedna jest jego dawcą, a druga – biorcą. Proces odbywa się za pośrednictwem fimbrii płciowych, przez które następuje przekazanie plazmidów R lub fragmentów chromosomalnego DNA (budowę komórki bakteryjnej omówiono w innym rozdziale monografii – Rozdział I: Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii).

Transdukcja to przenoszenie materiału genetycznego pomiędzy komórkami bakterii za pośrednictwem bakteriofagów, czyli wirusów atakujących bakterie. Proces ma szczególne znaczenie w nabywaniu przez prokarioty istotnych właściwości patogennych, np. zdolności do syntezy toksyn.

Transformacja natomiast polega na bezpośrednim pobieraniu ze środowiska materiału genetycznego, który pojawił się tu wskutek śmierci (rozpadu) komórki bakteryjnej będącej źródłem określonych genów lekooporności. Jest to rzadkie zjawisko.

## Naturalna oporność na leki przeciwbakteryjne

Oporność na antybiotyki to jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Rodzaje lekooporności drobnoustrojów (mikrobiologiczną, kliniczną, krzyżową, naturalną i nabytą) scharakteryzowano w poprzednim rozdziale monografii (Rozdział V: Metody zwalczania bakterii – leki przeciwbakteryjne).

Oporność naturalna, inaczej oporność wrodzona, jest stałą cechą określonej grupy taksonomicznej drobnoustrojów (np. rodziny, rodzaju, gatunku), kodowaną na chromosomie bakteryjnym (Christaki i in., 2020; Heczko i Wójkowska-Mach, 2009; Martinez, 2014).

Wiedza na temat występowania oporności naturalnej wśród najważniejszych czynników etiologicznych infekcji, a także zrozumienie mechanizmów leżących u jej podstaw, znacznie ułatwiają podjęcie decyzji co do potencjalnej terapii przeciwbakteryjnej. Pewne leki po prostu w ogóle nie powinny być brane pod uwagę przy opracowywaniu koncepcji leczenia. Zaordynowanie terapii antybiotykiem, wobec którego patogen wykazuje oporność wrodzoną, to poważny błąd. Jest zatem oczywiste, że także w trakcie prowadzenia diagnostyki mikrobiologicznej nie sprawdza się wrażliwości drobnoustroju na leki, na które jest on naturalnie odporny.

Niżej przedstawiono przykłady lekooporności naturalnej bakterii, o których warto pamiętać (Dzierżanowska, 2019; Intrinsic resistance, 2020; Heczko i Wójkowska-Mach, 2009; Hryniewicz i in., 2020; Hryniewicz i Mészáros, 2002; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

Jednym z takich przykładów jest wrodzona oporność pałeczek fermentujących rzędu *Enterobacteriales*, będących drobnoustrojami Gram-ujemnymi, na penicylinę benzylową (antybiotyk ten wykazuje aktywność w stosunku do bakterii Gram-dodatnich).

Oporność naturalna może być następstwem braku punktu uchwytu (celu) dla antybiotyku w komórce bakteryjnej (z tego powodu bakterie atypowe, np. chlamydie i mykoplazmy, są naturalnie odporne na antybiotyki beta-laktamowe) lub niskiego powinowactwa leku do celu (np. brak aktywności cefalosporyn i penicylin izoksazolilowych wobec enterokoków).

U pałeczek należących do rzędu *Enterobacteriales* (np. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) niemożliwa jest penetracja antybiotyków glikopeptydowych przez ścianę komórkową (ze względu na obecność błony zewnętrznej), stąd ich naturalna oporność na tę grupę leków przeciwdrobnoustrojowych. Penetracja aminoglikozydów jest z kolei bardzo ograniczona u paciorkowców i enterokoków – bakterie uznaje się za naturalnie odporne na antybiotyki aminoglikozydowe.

Naturalną oporność na wankomycynę, wskutek stałej obecności genu *vanC*, stwierdzono u *Enterococcus gallinarum* i *Enterococcus casseliflavus*.

Gram-ujemne pałeczki fermentujące (czyli bakterie rzędu *Enterobacteriales*), poza wspomnianą wcześniej wrodzoną opornością na penicylinę benzylową i glikopeptydy, wykazują także oporność naturalną na kwas fusydowy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, rifampicynę, daptomycynę i linezolid. Dodatkowo *Klebsiella pneumoniae* jest gatunkiem naturalnie odpornym na ampicylinę i tikarcylinę, pałeczki z rodzajów *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* – na tigecyklinę, kolistynę i nitrofurantoinę, a *Morganella* spp. – na kolistynę i nitrofurantoinę.

Pałeczki Gram-ujemne niefermentujące (m.in. *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Acinetobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Elizabethkingia* spp.) wykazują wrodzoną oporność na penicylinę benzylową, ampicylinę, cefalosporyny I i II generacji, ertapenem, glikopeptydy, kwas fusydowy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, rifampicynę, daptomycynę oraz linezolid. Wszystkie te bakterie – z wyjątkiem *Achromobacter* spp. – są odporne na amoksylicynę z kwasem klawulanowym. Naturalnie odporne na imipenem i meropenem są *Stenotrophomonas* spp. i *Elizabethkingia* spp. *Pseudomonas* spp. jest naturalnie odporny na tigecyklinę, natomiast

*Burkholderia* spp. i *Elizabethkingia* spp. – na kolistynę. Wszystkie pałeczki niefermentujące, z wyjątkiem *Pseudomonas* spp. i *Achromobacter* spp., wykazują naturalną oporność na aztreonam.

Bakterie Gram-dodatnie wykazują oporność wrodzoną na aztreonam, temocylinę, polimiksynę E (kolistynę) i kwas nalidyksowy. Na kwas fusydowy naturalnie odporne są paciorkowce, enterokoki i *Staphylococcus saprophyticus*, na ceftazydym – gronkowce, paciorkowce, enterokoki i *Listeria* spp., na makrolidy – enterokoki.

## Nabyta oporność na leki przeciwbakteryjne

O oporności nabytej mówi się, gdy wrażliwe początkowo bakterie nabywają oporność na lek wskutek przypadkowej mutacji w swoim materiale genetycznym lub w wyniku nabycia genu lub genów oporności na lek od innych bakterii. Geny oporności zostają ulokowane w chromosomie bakteryjnym, na plazmidach, w integronach lub transpozonach. Zmiana ta staje się dziedziczna.

Jeżeli lekarz, który jeszcze nie dysponuje wynikami badania mikrobiologicznego, wie, jakiego rodzaju oporności nabytej należy spodziewać się u najbardziej prawdopodobnego czynnika etiologicznego infekcji i rozumie jej mechanizmy, trafniej dobierze leczenie empiryczne, które – po uzyskaniu wyników badania lekowrażliwości – będzie wymagać np. tylko niewielkiej korekty. Trzeba też podkreślić, że w trakcie diagnostyki mikrobiologicznej u zidentyfikowanego patogenu obowiązkowo bada się występowanie charakterystycznych dla niego mechanizmów oporności nabytej (EUCAST, 2022). Wiedza ta, w połączeniu z właściwą interpretacją, pozwala istotnie zmniejszyć ryzyko niepowodzenia terapii.

Opisano wiele niezwykle istotnych z klinicznego punktu widzenia przykładów bakteryjnej lekooporności nabytej. Trzeba je znać i umieć zinterpretować (Dzierżanowska, 2019; Heczko i Wójkowska-Mach, 2009; Hryniewicz i Mészáros, 2002; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020).

MRSA to szczep *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Szczep bakteryjny oznaczony jako MRSA jest oporny na wszystkie leki z grupy antybiotyków beta-laktamowych z wyjątkiem tzw. V generacji cefalosporyn – ceftaroliny i ceftobiprolu.

VISA to szczep *Staphylococcus aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (ang. *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*), natomiast VRSA jest szczepem *Staphylococcus aureus* opornym na wankomycynę (ang. *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*). Prawidłowa interpretacja mechanizmów VISA i VRSA to oporność na wankomycynę. W przypadku, gdy izolat *Staphylococcus aureus* wykazuje obniżoną wrażliwość lub oporność nie tylko na wankomycynę, ale także na teikoplaninę, mechanizmy tej oporności nabytej określa się odpowiednio jako GISA (ang. *glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus*) lub GRSA (ang. *glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus*). Co istotne, zjawisko oporności nabytej na antybiotyki glikopeptydowe odnotowywane jest również wśród szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych.

PRP to szczep *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) oporny na penicylinę (ang. *penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae*) i taka też jest interpretacja kliniczna omawianej oporności nabytej. Należy pamiętać, że szczepy PRP nie syntetyzują beta-laktamaz.

MLS oznacza oporność nabytą na makrolidy, linkozamidy i streptograminy grupy B (ang. *macrolide-lincosamide-streptogramin B*). Mechanizm, który może występować u gronkowców i paciorkowców, wyklucza z terapii aż trzy różne grupy chemiczne leków przeciwbakteryjnych, tj. makrolidy, linkozamidy i streptograminy B.

HLAR to oporność na wysokie stężenia aminoglikozydów (ang. *high-level aminoglycoside resistance*). Występuje u enterokoków. Szczep z rodzaju *Enterococcus*, oznaczony jako HLAR, charakteryzuje się wysokim stopniem oporności na aminoglikozydy. Niekorzystnym następstwem oporności typu HLAR jest brak możliwości uzyskania synergizmu pomiędzy antybiotykami aminoglikozydowymi i antybiotykami beta-laktamowymi lub glikopeptydami (niezwykle cennej terapii skojarzonej, stosowanej u pacjentów hospitalizowanych, cierpiących na ciężkie zakażenia).

VRE to szczep enterokoków opornych na wankomycynę lub wankomycynę i teikoplaninę (ang. *vancomycin-resistant Enterococcus*). Poprawna interpretacja oporności VRE wymaga wykluczenia glikopeptydów z terapii.

ESBL to beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ang. *extended-spectrum beta-lactamases*). Szczep bakteryjny oznaczony jako ESBL (np. *Escherichia coli* ESBL) jest zdolny do hydrolizy penicylin, cefalosporyn (z wyjątkiem cefamycyn) i monobaktamów. Wykazuje jednak wrażliwość na działanie antybiotyków beta-laktamowych w połączeniu z inhibitorami beta-laktamaz.

AmpC to beta-laktamaza, będąca chromosomalną cefalosporynazą (ang. *AmpC cephalosporinase*). Szczep bakteryjny oznaczony jako AmpC hydrolizuje penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem IV generacji) i aztreonam. Z reguły nie jest on też podatny na działanie antybiotyków beta-laktamowych w połączeniu z inhibitorami beta-laktamaz. Może być wrażliwy na cefepim i karbapenemy, więc jeśli rozważa się terapię z użyciem antybiotyków beta-laktamowych, to należy wybierać tylko spośród wyżej wymienionych.

KPC to szczep *Klebsiella pneumoniae* oporny na karbapenemy (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*). Szczep bakteryjny oznaczony jako KPC wytwarza beta-laktamazy zwane karbapenemazami, które są w stanie przeprowadzić hydrolizę wszystkich antybiotyków beta-laktamowych, jakie wykazywałyby aktywność wobec szczepu KPC-ujemnego. Zakażenia wywoływane przez szczepy KPC są zwykle bardzo trudne do wyleczenia. W praktyce nie można bowiem zastosować terapii żadnym antybiotykiem beta-laktamowym, a ponadto izolaty te bardzo często wykazują wrażliwość jedynie na kilka leków przeciwbakteryjnych, innych niż antybiotyki beta-laktamowe: gentamicynę, amikacynę (niekiedy), kolistynę, tigecyklinę. Oporność KPC po raz pierwszy wykryto u szczepu z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, stąd jego nazwa. Dziś jednak wiadomo, że tego typu karbapenemazy mogą wytwarzać również inne rodzaje Gram-ujemnych pałeczek fermentujących (*Escherichia*, *Enterobacter*), jak i Gram-ujemne pałeczki niefermentujące (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.).

OXA-48 (ang. *oxacillinase-48*) to pierwsza nabyta, kodowana plazmidowo karbapenemaza (tzw. beta-laktamaza klasy D), hydrolizująca karbapenemy. Wiele szczepów bakteryjnych wytwarzających OXA-48 wykazuje wyraźną oporność na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe.

Szczep bakteryjny dysponujący opornością nabytą oznaczoną jako NDM (ang. *New Delhi metallo-beta-lactamase*) jest producentem metalo-beta-laktamazy (ang. *metallo-beta-lactamase*, MBL) typu New Delhi. Enzymy MBL hydrolizują penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy. Nieskuteczne w stosunku do MBL-dodatnich szczepów bakteryjnych są także połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhibitorami beta-laktamaz. W praktyce terapia tego rodzaju zakażeń stanowi ogromne wyzwanie dla lekarza klinicysty, ponieważ możliwymi do zastosowania lekami mogą okazać się wyłącznie: aztreonam (antybiotyk beta-laktamowy) i kolistyna (polimyksyna E). Oprócz NDM do MBL należy m.in. również VIM (ang. *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*). Enzymy MBL tym różnią się od klasycznych beta-laktamaz, że hydrolizują antybiotyki beta-laktamowe za pośrednictwem swego aktywnego centrum, zawierającego jeden lub kilka jonów cynku.

Typy lekooporności nabytej, oznaczone jako ESBL, AmpC, KPC, OXA-48 i MBL, występują wyłącznie u pałeczek Gram-ujemnych, zarówno fermentujących, jak i niefermentujących. Oporność wymienionych patogenów na antybiotyki beta-laktamowe jest niezwykle złożona i cechuje się dużą dynamiką. Zrozumienie zjawiska, a także śledzenie na bieżąco zmian zachodzących na tym polu, pozwoli lekarzowi praktykowi skutecznie leczyć pacjentów zakażonych lekoopornymi pałeczkami Gram-ujemnymi.

Podłożem lekooporności ESBL, AmpC, KPC, OXA-48 i MBL jest zawsze zdolność szczepów prokariotycznych do wytwarzania enzymów hydrolizujących antybiotyki beta-laktamowe, przy czym – jak wyżej wykazano – spektrum aktywności wydzielanych bakteryjnych białek enzymatycznych jest różnicowane. W Tabeli 1 podsumowano najważniejsze informacje na temat oporności typu ESBL, AmpC, KPC, OXA-48 i MBL.

Warto podkreślić, że w stosunku do szczepów prezentujących wyżej wymienione mechanizmy oporności nabytej aktywność mogą wykazywać nowe połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhibitorami beta-laktamaz:

- ceftolozan z tazobaktamem wobec szczepów ESBL,
- ceftazydym z awibaktamem wobec szczepów ESBL, AmpC, KPC i OXA-48,
- meropenem z waborbaktamem wobec szczepów ESBL, AmpC i KPC,
- imipenem z cilastatyną i relebaktamem wobec szczepów ESBL, AmpC i KPC (Petrosillo i in., 2019; Sansone i in., 2022; Wong i van Duin, 2017).

**Tabela 1.** Przegląd najważniejszych mechanizmów lekooporności pałeczek Gram-ujemnych (Dzierżanowska, 2019; Heczko i Wójkowska-Mach, 2009; Hryniewicz i Mészáros, 2002; Jean i in., 2019; Petrosillo i in., 2019; Sansone i in., 2022; Wong i van Duin, 2017).

<b>Mechanizm oporności</b>	<b>Rodzaje bakterii, u których mechanizm bywa wykrywany</b>	<b>Inaktywowane leki</b>	<b>Możliwe alternatywy terapeutyczne</b>
ESBL	<i>Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Acinetobacter</i>	penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem cefamycyn), monobaktamy	połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhibitorami beta-laktamaz, meropenem
AmpC	<i>Acinetobacter, Pseudomonas, Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Morganella, Providencia, Klebsiella, Proteus</i>	penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem IV generacji), aztreonam	cefepim, karbapenemy, nowe połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhibitorami beta-laktamaz
KPC <sup>1</sup>	<i>Klebsiella, Escherichia, Enterobacter, Pseudomonas, Acinetobacter</i>	penicyliny, cefalosporyny, monobaktamy, karbapenemy	gentamicyna, kolistyna, tigecyklina, amikacyna, nowe połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhibitorami beta-laktamaz, cefiderokol, erawacyklina
OXA-48 <sup>1</sup>	<i>Klebsiella, Escherichia, Enterobacter</i>	penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy	aztreonam, kolistyna, nowe połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhibitorami beta-laktamaz, cefiderokol, erawacyklina

**Tabela 1.** Przegląd najważniejszych mechanizmów lekooporności pałeczek Gram-ujemnych... (cd.)

MBL:	<i>Pseudomonas, Acinetobacter,</i>	penicyliny, cefalosporyny,	aztreonam, kolistyna,
NDM <sup>1</sup>	<i>Achromobacter, Citrobacter,</i>	karbapenemy, połączenia	nowe połączenia anty-
VIM <sup>1</sup>	<i>Enterobacter, Escherichia,</i>	antybiotyków beta-lakta-	biotyków beta-laktamo-
	<i>Klebsiella, Providencia,</i>	mowych z inhibitorami	wych z inhibitorami beta-
	<i>Proteus, Serratia</i>	beta-laktamaz	-laktamaz, cefiderokol, erawacyklina
MCR	<i>Escherichia, Klebsiella,</i>	polimyksyny (kolistyna)	karbapenemy, aminogli- kozydy, tigecyklina, nowe połączenia antybiotyków beta-laktamowych z inhi- bitorami beta-laktamaz, cefiderokol
	<i>Pseudomonas, Salmonella,</i>		
	<i>Enterobacter</i>		

<sup>1</sup>Karbapenemazy wytwarzane przez szczepy bakterii należących do rzędu *Enterobacterales*, najczęściej identyfikowane w Polsce, dane według danych Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) w latach 2006–2018.

W Tabeli 1 zawarto także podstawowe informacje na temat kodowanej plazmidowo oporności nabytej oznaczanej jako MCR (ang. *mobilized colistin resistance*). Jej występowanie również ogranicza się wyłącznie do pałeczek Gram-ujemnych: fermentujących (np. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp.) i niefermentujących (*Pseudomonas* spp.). Oznacza brak wrażliwości drobnoustrojów na polimyksynę E (kolistynę), czyli – w przeciwieństwie do pozostałych mechanizmów oporności nabytej, wymienionych w tabeli powyżej – nie odnosi się do antybiotyków beta-laktamowych. Oporności typu MCR bardzo często towarzyszy oporność na leki przeciwbakteryjne z pozostałych grup chemicznych. W Tabeli 1 wskazano możliwe alternatywy terapeutyczne wobec szczepów MCR.

## Wielolekooporność

Wśród bakterii coraz bardziej powszechne jest zjawisko wielolekooporności (Abat i in., 2018; Magiorakos i in., 2012; Dzierżanowska, 2019; Hryniewicz i in., 2020; Żukowska i Hryniewicz, 2020). Wielolekooporność (ang. *multidrug resistance*, MDR) oznacza niewrażliwość drobnoustroju na co najmniej jeden lek przeciwbakteryjny z co najmniej trzech grup chemicznych wykazujących aktywność w stosunku do określonego gatunku patogenu. Jeżeli szczep bakteryjny wykazuje brak wrażliwości na co najmniej jeden lek przeciwdrobnoustrojowy w większości grup chemicznych (z wyjątkiem dwóch lub jednej grupy), to prezentuje on tzw. oporność rozszerzoną (ang. *extensive resistance*, XDR). Niewrażliwość na wszystkie dostępne leki przeciwbakteryjne określana jest jako całkowita oporność (ang. *pandrug resistance*, PDR).

Oporność eliminuje z terapii przeciwdrobnoustrojowej leki o dobrze udokumentowanej skuteczności i bezpieczeństwie, a więc zwiększa ryzyko niepowodzenia i działań niepożądanych oraz podnosi koszty leczenia.



## Przykłady najważniejszych mechanizmów oporności bakterii na leki z różnych grup chemicznych

Jak wspomniano przy okazji omawiania zjawiska lekooporności naturalnej i nabytej, znajomość i rozumienie mechanizmów, które je determinują, w istotny sposób pomagają lekarzowi w prawidłowym doborze antybiotykoterapii. Dlatego w dalszej części rozdziału wymieniono i wyjaśniono w zwięzły sposób najważniejsze mechanizmy lekooporności bakteryjnej w odniesieniu do poszczególnych grup leków przeciwdrobnoustrojowych (Dzierżanowska, 2019; Heczko i Wójkowska-Mach, 2009; Hryniewicz i Mészáros, 2002). Należy pamiętać, że wykryty u bakterii mechanizm lekooporności determinuje jego określoną interpretację kliniczną.

### OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI BETA-LAKTAMOWE

Do najważniejszych mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki beta-laktamowe należą:

- wytwarzanie białek PBP o niskim powinowactwie do tych leków (dzieje się tak poprzez modyfikację własnych genów *pbp* lub nabycie genu, kodującego nowe białko PBP),
- zmniejszanie przepuszczalności błony zewnętrznej dla antybiotyków (poprzez modyfikację profili kanałów porynowych),
- wypompowywanie leków z komórki bakteryjnej (tzw. *efflux pump*, poprzez zwiększanie aktywności systemów pompowo-porynowych),
- wytwarzanie beta-laktamaz (czyli enzymów hydrolizujących antybiotyki beta-laktamowe).

U różnych grup bakterii wykrywa się różne mechanizmy oporności na antybiotyki beta-laktamowe. Niżej wymieniono te, o których obecnie należy pamiętać.

Drobnoustroje z gatunku *Staphylococcus aureus* mogą wytwarzać klasyczne beta-laktamazy o aktywności penicylinaz, które są w stanie inaktywować wyłącznie benzylopenicyliny (zjawisko to jest dziś niezwykle powszechne wśród gronkowców). W tym przypadku wobec bakterii nadal jednak będą aktywne półsyntetyczne penicyliny o aktywności przeciwgronkowcowej, tzw. penicyliny izoksazolilowe (np. kloksacylina). Drugi i niestety bardziej niekorzystny mechanizm oporności *Staphylococcus aureus* na antybiotyki beta-laktamowe to tzw. metycylinooporność (MRSA), wynikająca z posiadania przez szczep bakteryjny genu *mecA*, determinującego powstawanie nowego białka PBP, tzw. PBP2a (lub PBP2'). W efekcie u gronkowca pojawia się oporność krzyżowa *in vivo* na niemal wszystkie antybiotyki beta-laktamowe – wyjątkiem są jedynie tzw. cefalosporyny V generacji: ceftobiprol i ceftarolina. Warto w tym miejscu dodać, że także inne gatunki gronkowców (np. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*) mogą produkować penicylinazy lub wykazywać metycylinooporność. Metycylinooporność wśród szczepów *Staphylococcus* spp. to poważny problem kliniczno-epidemiologiczny (Bigos i in., 2011; Bigos i in., 2010; Khan i in., 2018; Narodowy Program Ochrony Antybiotyków – Rekomendacje diagnostyki i terapii zakażeń; Rybak i in., 2020; Turner i in., 2019; Empel i in., 2021).

Oporność na penicylinę u *Streptococcus pneumoniae* jest wynikiem obniżenia powinowactwa białek PBP do tego antybiotyku beta-laktamowego. W konsekwencji penicylina traci skuteczność wobec pneumokoka. Niskie powinowactwo białek PBP do penicyliny może wynikać z nadprodukcji tych białek, jak również być następstwem mutacji punktowych w genach mozaikowych, kodujących białka PBP (takie zmodyfikowane białka PBP mogą dodatkowo determinować oporność szczepu na cefalosporyny i amoksyycylinę). *Streptococcus pneumoniae* nie wytwarza beta-laktamaz.

Oporność na antybiotyki beta-laktamowe wśród bakterii Gram-ujemnych jest najczęściej wynikiem zmniejszenia przepuszczalności zewnętrznej warstwy ściany komórkowej, czyli tzw. zewnętrznej błony plazmatycznej (zjawisko szczególnie nasilone u *Pseudomonas aeruginosa*), jak również wypompowywania leków z komórek bakteryjnych (poprzez zwiększanie aktywności systemów pompowo-porynowych) oraz zdolności do syntezy beta-laktamaz o bardzo zróżnicowanym spektrum. Beta-laktamazy pałeczek Gram-ujemnych to obecnie największy problem kliniczno-epidemiologiczny (Baraniak i in., 2016; Brolund i in., 2019; ECDC, 2019; Narodowy Program Ochrony Antybio-

tyków – Karbapenemazy; Magiorakos i in., 2017; Narodowy Program Ochrony Antybiotyków – Rekomendacje diagnostyki i terapii zakażeń). Według skali Amblera (Kanji i Kanafani, 2011), zalicza się do nich:

- cefalosporynazy klasy C (tzw. beta-laktamazy AmpC),
- beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym klas A i D (tzw. beta-laktamazy ESBL, np. TEM – ang. *Temoniera beta-lactamase*, SHV – ang. *sulphydryl variable-type beta-lactamase*),
- metalo-beta-laktamazy klasy B (tzw. beta-laktamazy MBL, np. NDM),
- karbapenemazy klasy A (tzw. beta-laktamazy KPC),
- karbapenemazy klasy D (tzw. beta-laktamazy CHDL – ang. *carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamases*, np. OXA-48) (Tabela 1).

Gram-ujemne ziarniako-pałeczki (mikroorganizmy pleomorficzne) z gatunku *Haemophilus influenzae* dysponują trzema ważnymi mechanizmami oporności na antybiotyki beta-laktamowe. Oznaczono je jako:

- BLPAR, ang. *beta-lactamase-positive, ampicillin-resistant*,
- BLNAR, ang. *beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant*,
- BLPACR, ang. *beta-lactamase-producing, amoxicillin-clavulanic acid-resistant*.

Szczepy BLNAR (posiadające zmodyfikowane białka PBP) i szczepy BLPACR (posiadające zmodyfikowane białka PBP, jak również wytwarzające beta-laktamazy) są raportowane jako odporne na ampicylinę, amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, ampicylinę z sulbaktamem, piperacylinę, piperacylinę z tazobaktamem, cefaklor, cefuroksym i cefuroksym aksetyl. Szczepy BLPAR (wytwarzające beta-laktamazy) są odporne na ampicylinę, amoksycylinę i piperacylinę.

#### OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI GLIKOPEPTYDOWE

Oporność bakterii na glikopeptydy wynika ze zmian w budowie ściany komórkowej, m.in. wskutek indukcji ekspresji genów odpowiedzialnych za wytwarzanie prekursorów peptydoglikanu, zakończonych następującymi, zmienionymi dipeptydami: D-Ala-D-Lac (geny *vanA*, *vanB*, *vanM*, *vanD*) i D-Ala-D-Ser (geny *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanN* i oporność naturalna – gen *vanC*). Z kliniczno-epidemiologicznego punktu widzenia na uwagę i ostrożność zasługuje oporność na glikopeptydy wśród enterokoków i gronkowców (enterokoki odporne na antybiotyki glikopeptydowe są dawcami genów oporności dla szczepów gronkowców, ich transmisja odbywa się na drodze koniugacji).

#### OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI AMINOGLIKOZYDOWE

Najważniejszym mechanizmem oporności bakterii na aminoglikozydy jest inaktywacja leków przez enzymy je modyfikujące (ang. *aminoglycoside-modifying enzymes*, AME):

- fosfotransferazy (ang. *phosphotransferase*, APH),
- acetylotransferazy (ang. *acetyltransferase*, AAC),
- adenylotransferazy (ang. *adenyltransferase*, ANT).

Powstałe w wyniku działania AME pochodne antybiotyków aminoglikozydowych tracą aktywność przeciwbakteryjną.

Geny kodujące AME znajdują się głównie na mobilnych elementach genetycznych (plazmidach, transpozonach, integronach). Często występują w grupach z genami oporności na inne leki przeciwbakteryjne.

## OPORNOŚĆ NA POZOSTAŁE LEKI PRZECIWBAKTERYJNE

Mechanizmy oporności bakterii na makrolidy, linkozamidy, streptograminy i ketolidy:

- zmiana struktury miejsca docelowego dla leku,
- inaktywacja leku wskutek jego modyfikacji enzymatycznej (esterazy, transferazy, fosforylasy, hydrolazy),
- wypompowywanie leku z komórki bakteryjnej.

Mechanizmy oporności prokariotów na rifampicynę:

- produkcja polimerazy RNA o zmniejszonym powinowactwie do leku,
- wypompowywanie leku z komórki.

Mechanizmy oporności bakterii na sulfonamidy i trimetoprim:

- wytwarzanie większej ilości enzymów szlaków metabolicznych, których działanie mogłoby być zaburzone przez lek,
- produkcja enzymów o obniżonym powinowactwie do leku,
- zaburzony transport leku do komórki.

Mechanizmy oporności bakterii na chinolony:

- mutacje w genach kodujących gyrazę i topoisomerazę IV,
- wypompowywanie leku z komórki,
- zaburzony transport leku do komórki.

Mechanizmy oporności bakterii na tetracykliny:

- zaburzony transport leku do komórki,
- zmiana budowy miejsca docelowego dla leku, wypompowywanie leku z komórki,
- enzymatyczna inaktywacja leku.

Mechanizmy oporności bakterii na oksazolidynony:

- mutacje w domenie V w 23S rRNA (mechanizm może występować u szczepów *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus* spp.),
- mutacje w rybosomalnym białku L4,
- metylacja w 23S rRNA.

Mechanizm oporności bakterii na kolistynę: obecność plazmidowo kodowanego genu *mcr*.

## Skuteczność terapii przeciwbakteryjnej

Skuteczność leków antybakteryjnych *in vivo* determinują ich właściwości farmakokinetyczno-farmakodynamiczne (Smuszkiewicz i in., 2007). Farmakokinetyka (ang. *pharmacokinetics*, PK) jest nauką o szybkości procesów wchłaniania, dystrybucji oraz eliminacji (biotransformacji i wydalania) leków. Farmakodynamika (ang. *pharmacodynamics*, PD) określa interakcję pomiędzy lekiem i drobnoustrojem w warunkach *in vivo*.

W celu oceny skuteczności terapii przeciwbakteryjnej opracowano trzy podstawowe wskaźniki stosunku PK/PD:

- $C_{max}/MIC$ ,
- $AUC_{24}/MIC$ ,
- $T > MIC$  (%) (Roberts i Lipman, 2009; Smuszkiewicz i in., 2007).

$C_{max}/MIC$  – to stosunek szczytowego stężenia leku uzyskanego po jego pojedynczej dawce,  $C_{max}$  (mg/L), do MIC. Do leków, których skuteczność zależy od stosunku  $C_{max}/MIC$ , należą: aminoglikozydy, fluorochinolony, metronidazol. Reasumując, antybiotyki stężenie-zależne charakteryzują się maksymalną aktywnością w chwili szczytowego stężenia leku w stosunku do MIC.

$AUC_{24}/MIC$  wyraża stosunek pola pod krzywą zależności zmian stężenia leku we krwi od czasu w ciągu 24 godzin,  $AUC_{24}$  (mg·h/L), do MIC. Do leków, których skuteczność zależy zarówno od czasu jak i stężenia ( $AUC_{24}/MIC$ ), należą: fluorochinolony, azytromycyna, tetracykliny, glikopeptydy.

T > MIC (%) to czas, w którym stężenie leku we krwi pozostaje powyżej MIC. Do leków, których skuteczność jest determinowana czasem utrzymywania się stężenia powyżej MIC (T > MIC), zalicza się: antybiotyki beta-laktamowe, linezolid, erytromycynę, klarytromycynę, klindamycynę. Podsumowując, czaso-zależne antybiotyki wykazują maksymalny efekt mikrobiologiczny, jeśli przez cały odstęp dawkowania stężenia tych leków utrzymują się jak najdłużej powyżej MIC.

## Leki pierwszego i drugiego rzutu w zakażeniach bakteryjnych

Lek pierwszego rzutu to lek z wyboru, od którego zaczyna się leczenie. Jeśli terapia lekiem pierwszego rzutu nie przynosi efektu bądź nie jest możliwa do zastosowania (np. z powodu nabytej przez szczep bakteryjny lekooporności lub gdy pacjent jest uczulony na określony antybiotyk), sięga się po lek drugiego rzutu. Rekomendacje dotyczące stosowania leków przeciwbakteryjnych są na bieżąco aktualizowane i publikowane na stronach internetowych towarzystw naukowych, organizacji normalizacyjnych oraz programów ochrony zdrowia, np. Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (Narodowy Program Ochrony Antybiotyków – Rekomendacje diagnostyki i terapii zakażeń, [www.antybiotyki.edu.pl](http://www.antybiotyki.edu.pl)).

### Bibliografia

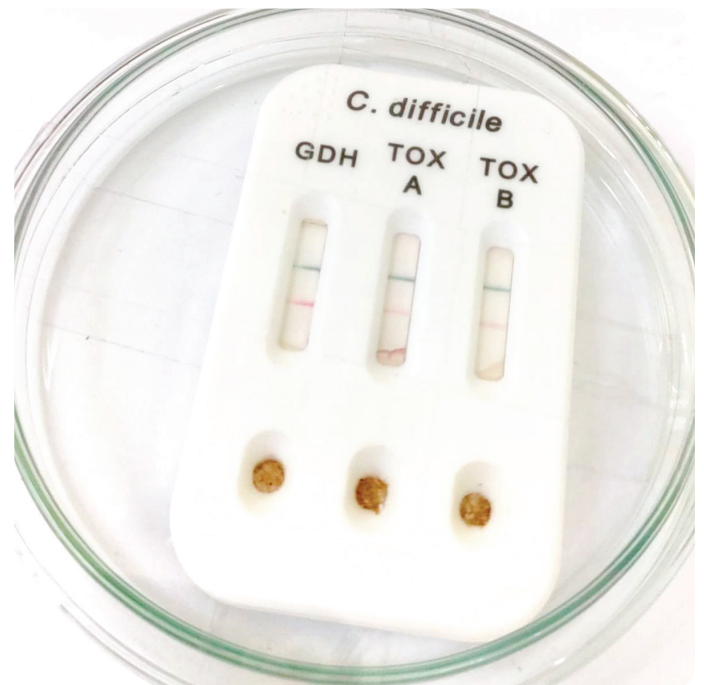
- Abat C., Fournier P.E., Jimeno M.T., Rolain J.M., Raoult D. 2018. Extremely and pandrug-resistant bacteria extra-deaths: myth or reality? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 37(9), str. 1687–1697. DOI: [10.1007/s10096-018-3300-0](https://doi.org/10.1007/s10096-018-3300-0).
- Baraniak A., Izdebski R., Fiett J., Gawryszewska I., Bojarska K., Herda M., Literacka E., Żabicka D., Tomczak H., Pawińska N., Szarata M., Ozorowski T., Milner A., Hryniewicz W., Gniadkowski M. 2016. NDM-producing *Enterobacteriaceae* in Poland, 2012–14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71, str. 85–91. DOI: [10.1093/jac/dkv282](https://doi.org/10.1093/jac/dkv282).
- Bigos M., Denys A., Brauncajs M. 2011. Analiza profile bakteriologicznego nieożywionego środowiska szpitalnego w związku ze zmianą okołoperacyjnej profilaktyki antybiotykowej. *Problemy Terapii Monitorowanej* 22(1/2), str. 13–21.
- Bigos M., Brauncajs M., Ciebada I., Denys A. 2010. Antybiotykowrażliwość szczepów *Staphylococcus* sp. izolowanych z oddziałów zabiegowych. *Problemy Terapii Monitorowanej* 21(2), str. 79–88.
- Brolund A., Lagerqvist N., Byfors S., Struelens M.J., Monnet D.L., Albiger B., Kohlenberg A., European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network EURGen-Net Capacity Survey Group. 2019. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance* 24(9). DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123).
- Christaki E., Marcou M., Tofarides A. 2020. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution* 88(1), str. 26–40. DOI: [10.1007/s00239-019-09914-3](https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3).
- Creager A.N. 2007. Adaptation or selection? Old issues and new stakes in the postwar debates over bacterial drug resistance. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 38(1), str. 159–190. DOI: [10.1016/j.shpsc.2006.06.016](https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2006.06.016).
- Durão P., Balbontín R., Gordo I. 2018. Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology* 26 (8), str. 677–691. DOI: [10.1016/j.tim.2018.01.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005).
- Dzierżanowska D. 2019. *Przewodnik antybiotykoterapii szpitalnej*, wyd. 2. Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała.
- Dzierżanowska-Fangrat K. 2022. *Przewodnik antybiotykoterapii 2022*, wyd. 27. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała.

- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2019. Regional outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, Italy, 2018–2019 – 4 June, 2019. Sztokholm; 2019. Dostępne online: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/04-Jun-2019-RRR-Carbapenems,%20Enterobacteriaceae-Italy.pdf> (dostęp: 15.09.2021).
- Empel J., Żabicka D., Hryniewicz W. 2021. Ziarenkowce Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*. Oznaczanie wrażliwości i wykrywanie mechanizmów oporności na antybiotyki beta-laktamowe. Dostępne online: <http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/Rekomendacje/Rekomendacje-Staphylococcus-oporno%C5%9B%C4%87-na-beta-laktamy.pdf> (dostęp: 02.11.2022).
- EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2022. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. Dostępne online: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf) (dostęp: 02.11.2022).
- Główny Inspektorat Sanitarny. 2020. *Europejski Dzień Wiedzy o Antybiotykach*. Dostępne online: <https://www.gov.pl/web/gis/europejski-dzien-wiedzy-o-antybiotykach> (dostęp: 7.02.2023).
- Heczko P.B., Wójkowska-Mach J. 2009. *Zakażenia szpitalne. Podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Hryniewicz W., Mészáros J. 2002. *Antybiotyki w profilaktyce i leczeniu zakażeń*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Hryniewicz W., Ozorowski T., Żukowska A. 2020. Szpitalna lista antybiotyków – 2020. Propozycja kierowana do szpitali. Dostępne online: [http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/2020/09/rekomendacje-antybiotyki\\_2020.09.02.pdf](http://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/2020/09/rekomendacje-antybiotyki_2020.09.02.pdf) (dostęp: 15.09.2021).
- Intrinsic resistance and unusual phenotypes, version 3.2, February 2020. Dostępne online: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/2020/Intrinsic\\_Resistance\\_and\\_Unusual\\_Phenotypes\\_Tables\\_v3.2\\_20200225.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2020/Intrinsic_Resistance_and_Unusual_Phenotypes_Tables_v3.2_20200225.pdf) (dostęp: 02.11.2022).
- Jean S.S., Gould I.M., Lee W.S., Hsueh P.R., International Society of Antimicrobial Chemotherapy (ISAC). 2019. New drugs for multidrug-resistant gram-negative organisms: time for stewardship. *Drugs* 79(7), str. 705–714. DOI: [10.1007/s40265-019-01112-1](https://doi.org/10.1007/s40265-019-01112-1).
- Karbapenemazy. 2019. Dostępne online: <http://antybiotyki.edu.pl/dokumenty/karbapenemazy/> (dostęp: 15.09.2021).
- Kanj S.S., Kanafani Z.A. 2011. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant Gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic Proceedings* 86(3) str. 250–259. DOI: [10.4065/mcp.2010.0674](https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0674).
- Khan A., Wilson B., Gould I.M. 2018. Current and future treatment options for community-associated MRSA infection. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 19(5), str. 457–470. DOI: [10.1080/14656566.2018.1442826](https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1442826).
- Magiorakos A.P., Burns K., Rodríguez Baño J., Borg M., Daikos G., Dumpis U., Lucet J.C., Moro M.L., Tacconelli E., Skov Simonsen G., Szilágyi E., Voss A., Weber J.T. 2017. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control, Antimicrobial Resistance and Infection Control. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 6, nr art. 113. DOI: [10.1186/s13756-017-0259-z](https://doi.org/10.1186/s13756-017-0259-z).
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopulous A., Weber J.T., Monnet D.L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18(3), str. 268–281. DOI: [10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x).
- Martinez J.L. 2014. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today Technologies* 11, str. 33–39. DOI: [10.1016/j.ddtec.2014.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001).
- Rekomendacje diagnostyki i terapii zakażeń. 2022. Dostępne online: <http://antybiotyki.edu.pl/rekomendacje/rekomendacje-diagnostyki-i-terapii-zakazen/> (dostęp: 15.09.2022).
- Roberts J., Lipman J. 2009. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Critical Care Medicine* 37(3), str. 840–851. DOI: [10.1097/CCM.0b013e3181961bff](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181961bff).
- Petrosillo N., Taglietti F., Granata G. 2019. Treatment options for colistin resistant *Klebsiella pneumoniae*: present and future. *Journal of Clinical Medicine* 8(7), str. 934. DOI: [10.3390/jcm8070934](https://doi.org/10.3390/jcm8070934).

- Sansone P., Giaccari L.G., Coppolino F., Aurilio C., Barbarisi A., Passavanti M.B., Pota V., Pace M.C. 2022. Cefiderocol for carbapenem-resistant bacteria: handle with care! A review of the real-world evidence. *Antibiotics (Basel)* 11(7), str. 904. DOI: [10.3390/antibiotics11070904](https://doi.org/10.3390/antibiotics11070904).
- Wong D., van Duin D. 2017. Novel beta-lactamase inhibitors: unlocking their potential in therapy. *Drugs* 77(6), str. 615–628. DOI: [10.1007/s40265-017-0725-1](https://doi.org/10.1007/s40265-017-0725-1).
- Rybak M.J., Le J., Lodise T.P., Levine D.P., Bradley J.S., Liu C., Mueller B.A., Pai M.P., Wong-Beringer A., Rotschafer J.C., Rodvold K.A., Maples H.D., Lomaestro B. 2020. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A Revised Consensus Guideline and Review by the American Society of Health-system Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clinical Infectious Diseases* 71(6), str. 1361–1364. DOI: [10.1093/cid/ciaa303](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa303).
- Smuszkiewicz P., Szafek E., Tomczak H., Trojanowska I., Błaszyk M. 2007. Farmakokinetyczno-farmakodynamiczne zasady stosowania antybiotyków u chorych leczonych z powodu sepsy. *Anestezjologia Intensywna Terapia* 3, str. 166–174.
- Szczeklik A., Gajewski P. 2022. *Interna Szczeklika 2022*, wyd. 13. Medycyna Praktyczna, Polski Instytut Evidence Based Medicine, Kraków.
- Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowler V.G. Jr. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology* 17(4), str. 203–218. DOI: [10.1038/s41579-018-0147-4](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4).
- Woodford N., Ellington M.J. 2007. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection* 13(1), str. 5–18. DOI: [10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x).
- Żukowska A., Hryniewicz W. 2020. Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki antybiotykowej zakażeń w szpitalu – 2020. Materiał przeznaczony dla komitetów terapeutycznych i zespołów ds. antybiotykoterapii. Dostępne online: [http://www.ses.edu.pl/files/rekomendacje-diagnostyki-terapii\\_2021.03.02.pdf](http://www.ses.edu.pl/files/rekomendacje-diagnostyki-terapii_2021.03.02.pdf) (dostęp: 15.09.2021).

# ROZDZIAŁ VII. MECHANIZMY PATOGENEZY ZAKAŻEŃ BAKTERYJNYCH

CHAPTER VII.  
MECHANISMS OF PATHOGENESIS  
OF BACTERIAL INFECTIONS



## Wprowadzenie

Mikroorganizm patogeny (patogen) to każdy drobnoustrój zdolny do wywołania choroby w organizmie gospodarza. Niektóre drobnoustroje są jednoznacznie patogenne, podczas gdy inne pozostają zazwyczaj niegroźne dla gospodarza. Możemy mieć też do czynienia z infekcjami przez długi czas bezobjawowymi (obecne w organizmie gospodarza patogeny wywołują pełnoobjawowe zakażenie w określonych okolicznościach). Przykładem tego typu bakterii są *Mycobacterium tuberculosis* i *Treponema pallidum* (Getahun i in., 2015; Mattei i in., 2012). Patogeny bezwzględne (obligatoryjne) to drobnoustroje powodujące infekcję u wszystkich ludzi, również tych z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Patogeny oportunistyczne (względne) to z kolei patogeny warunkowo chorobotwórcze, wywołujące zakażenia u osób z dysfunkcjami układu odpornościowego i/lub zaburzeniami równowagi mikrobioty bądź pojawiające się w miejscach fizjologicznie jałowych (Lewinson, 2014).

Na chorobotwórczość (patogenność) drobnoustroju składają się trzy elementy: transmisja, zakaźność i zjadliwość patogenu. Transmisja to zdolność patogenu do rozprzestrzeniania się w populacji. Można wyróżnić wiele dróg transmisji, m.in. kontakt bezpośredni człowiek–człowiek, transmisję za pośrednictwem wody, pokarmu czy wektorów, np. kleszczy. Zakaźność (infekcyjność) charakteryzuje się zdolnością patogenu do wywołania infekcji. Zjadliwość, inaczej wirulencja, to natomiast szereg cech drobnoustroju, umożliwiających przełamanie barier odpornościowych, namnożenie się tych mikroorganizmów i uszkodzenie tkanek organizmu gospodarza. Do czynników wirulencji (inaczej: czynników chorobotwórczości, czynników zjadliwości) należą integralne elementy strukturalne komórki bakteryjnej (np. otoczka, adhezyny, rzęski – ich znaczenie dla komórki bakteryjnej, jak również w patogenezie zakażeń, omówiono w innym rozdziale monografii – Rozdział I: Klasyfikacja, budowa i rozmnażanie bakterii) oraz substancje wydzielane na zewnątrz (egzoenzymy, toksyny, siderofory). Obecność określonych czynników wirulencji decyduje o inwazyjności (zdolności do penetrowania, namnażania się i uszkodzania komórek, tkanek gospodarza) i toksynogenności (zdolności do wytwarzania toksyn) bakterii. Dany czynnik zjadliwości może być charakterystyczny dla wszystkich bakterii z rodzaju czy gatunku lub tylko dla danego szczepu. Często pojęcia chorobotwórczość i zjadliwość stosowane są zamiennie. Jednak w przeciwieństwie do patogenności zjadliwość to parametr, który można określić ilościowo. Miarą zjadliwości patogenu jest dawka zakaźna (ang. *infectious dose*, ID), czyli minimalna liczba drobnoustrojów potrzebna do wywołania choroby we wrażliwym makroorganizmie (ID, oznaczana jako ID<sub>50</sub>, to parametr określający liczbę komórek bakteryjnych niezbędnych do wywołania infekcji u 50% zakażonych) (Cornelissen i in., 2013). Wiedza na temat czynników chorobotwórczości bakterii jest niezbędna do tego, by dobrze rozumieć przebieg kliniczny zakażenia i móc przewidywać jego najbardziej prawdopodobne następstwa (Bigos i in., 2022).

Zależnie od czynników wirulencji, liczby komórek prokariotycznych oraz kondycji układu odpornościowego gospodarza, do którego patogen wnika, może dojść do eliminacji drobnoustroju lub do rozwoju zakażenia. Chociaż mechanizmy patogenezy bakteryjnej mogą się różnić pod kątem etiologii (na poziomie rodzaju, gatunku, a nawet szczepu), w procesie rozwoju infekcji bakteryjnej wyróżnia się kilka etapów wspólnych. Ryzyko pełnego rozwoju infekcji zależy m.in. od tego, czy drobnoustrojowi uda się ukończyć wszystkie z tych etapów, czy tylko niektóre z nich. Do podstawowych etapów rozwoju infekcji bakteryjnej należą:

- wnikanie do makroorganizmu,
- adhezja,
- kolonizacja,
- inwazja.

Początkowy etap rozwoju zakażenia o etiologii bakteryjnej to wnikanie do organizmu gospodarza. Patogen pokonuje pierwszą linię obrony gospodarza na drodze biernej (np. dostaje się do makroorganizmu z pokarmem, podczas oddychania lub w wyniku urazu mechanicznego) lub aktywnej (w procesie wnikania do organizmu gospodarza udział biorą np. wydzielane przez drobnoustrój toksyny czy powierzchniowe elementy budujące komórkę bakteryjną, jak otoczka, glikokaliks)



(Abbas i in., 2015; Bryniarski, 2018). Aby doszło do rozwoju zakażenia, drobnoustrój nie musi wcale wnikać z zewnątrz (jak to jest w przypadku tzw. infekcji egzogennej). Może też bowiem pochodzić z organizmu gospodarza, w obrębie którego przedostaje się z charakterystycznej, zajmowanej przez siebie niszy fizjologicznej do miejsca, w którym nie powinno go być, np. do jałowej tkanki (tzw. zakażenie endogenne) (Heczko i in., 2015).

Po etapie wnikania następuje etap adhezji (przylegania do komórek makroorganizmu), umożliwiającą następnie zasiedlanie organizmu gospodarza. Pierwotna adhezja (asocjacja) jest odwracalna. Do przylegania dochodzi w sposób bierny lub ukierunkowany przez chemoatraktanty (chemotaksyny, substancje przyciągające). Adhezja wtórna jest trwałym, nieodwracalnym zakotwiczeniem bakterii do powierzchni komórek makroorganizmu czy innych struktur przez wiążące adhezyny, np. do specyficznych receptorów. Do adhezyn należą m.in. fimbrie adhezyjne, adhezyny związane z rzęskami, komponenty osłon komórki prokariotycznej (np. hemaglutyniny, białka wiążące przeciwciała, białka wiążące fibronektynę, fibrynogen, elastynę lub kolagen, polimery otoczek bakteryjnych, glikokaliksu lub warstwy śluzowej, kwas tejchojowy bakterii Gram-dodatnich) (Murray i in., 2014; Alley i in., 2018).

Kolonizacja (zasiedlenie) to z kolei ścisły kontakt bakterii z organizmem gospodarza, wiodący do ustabilizowania się populacji bakteryjnej w danym miejscu makroorganizmu. W tym momencie rozwoju infekcji sprawnie działające mechanizmy obronne organizmu gospodarza nie są już w stanie usunąć bakterii. To *de facto* etap decydujący albo o ustaleniu statusu nosicielstwa, albo o rozwoju procesu chorobowego. Bakterie, które związały się z komórkami gospodarza lub inną powierzchnią (np. nieożywioną), mogą się dalej integrować w otaczającym je środowisku – w najbliższym otoczeniu wytwarzają wspólnie substancje śluzowe (macierz, polisacharydowe polimery zewnątrzkomórkowe), spełniające funkcje ochronne i spajające. Z czasem może dochodzić do zwiększania gęstości i zróżnicowania fenotypowego bakterii na różnych poziomach powstającego w ten sposób biofilmu – jest to naturalna forma bytowania mikroflory w naszym organizmie (np. w postaci płytki nazębnej). Biofilmowi bakteryjnemu przypisuje się obecnie kluczową rolę w patogenezie wielu chorób infekcyjnych (np. próchnicy zębów czy zakażeniach towarzyszących inwazyjnym zabiegom chirurgicznym, w trakcie których wykorzystywane są biomateriały takie jak implanty, cewniki, protezy). Bakterie kolonizują biomateriały dzięki adhezynom reagującym ze składnikami płynów ustrojowych lub glikoproteinami zewnątrzkomórkowej macierzy, bezpośrednio pokrywającymi powierzchnię biomateriału. Leczenie infekcji, w której zasadniczą rolę odgrywa biofilm, jest niezwykle trudne. Najczęściej eliminowane są formy planktonowe komórek bakteryjnych, a właściwa struktura biofilmu pozostaje nienaruszona i dalej wykazuje dużą aktywność metaboliczną. Biofilm funkcjonuje podobnie jak organizm wielokomórkowy, w którym poszczególne komórki porozumiewają się między sobą za pomocą substancji chemicznych i odpowiednio reagują na zmiany w środowisku. Zjawisko owo, z języka angielskiego, nosi nazwę *quorum sensing* (Costerton i in., 2007; Lazar, 2011; Mukherjee i Bassler, 2019; Magana i in., 2018). Leczenie zakażeń wywoływanych przez bakterie zdolne do tworzenia biofilmu stanowi poważne wyzwanie (Ramasamy i Lee, 2016).

Podczas inwazji patogen penetruje komórki i tkanki gospodarza, co determinuje możliwość jego dalszego rozprzestrzeniania się w makroorganizmie, a zatem także – charakter infekcji (zakażenie miejscowe lub uogólnione). W procesie wykorzystywane są inwazyjny, białka błonowe, którymi dysponują bakterie.

Po inwazji do komórek gospodarza w jego organizmie rozwija się stan zapalny. Wyróżnia się bakteryjne zapalenia ropne i ziarniniakowe. Zapalenie ropne, które charakteryzuje przewaga napływających neutrofilów, wywoływane jest głównie przez ziarenkowce Gram-dodatnie bądź Gram-ujemne. Natomiast zapalenie ziarniniakowe, w którym dominuje naciek makrofagów i limfocytów T, najczęściej pojawia się w zakażeniu o etiologii *Mycobacterium tuberculosis*. Obecne w ziarniniaku makrofagi w procesie fagocytozy zabijają większość komórek bakteryjnych, jednak niewielka ich część przeżywa wewnątrz fagosomów, gdzie – nawet przez długie lata – przebywa w utajeniu, w oczekiwaniu na warunki sprzyjające reaktywacji infekcji (Cardona, 2018).

W rozdziale omówiono rolę enzymów i toksyn bakteryjnych oraz sideroforów w patogenezie zakażeń wywoływanych przez prokarioty, wyjaśniono podstawy genetyczne patogenności bakterii,

wymieniono i pokrótce scharakteryzowano najważniejsze mechanizmy unikania przez bakterie odpowiedzi immunologicznej.

## Enzymy bakteryjne

Inwazyjne mogą niekiedy połączyć się z odpowiednimi receptorami dopiero po zadziałaniu enzymów hydrolitycznych (degradujących), umożliwiających odsłonięcie swoistych receptorów gospodarza. Przykłady enzymów ułatwiających inwazję bakteryjną, będących istotnymi czynnikami wirulencji prokariotów, przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Egzoenzymy bakteryjne (Arpigny i Jaeger, 1999; Flores-Díaz i in., 2016; Mayer, 1993).

Przykłady	Sposób działania
Katalaza Dysmutazy ponadtlenkowe	neutralizacja reaktywnych form tlenu
Hialuronidazy Neuraminidazy	rozrzedzenie substancji podstawnej tkanki łącznej
Kolagenazy Elastazy	niszczenie warstwy tkanki podskórnej, kostnej, chrzęstnej
Deoksyrybonukleazy (DNazy, ang. <i>DNases</i> )	degradacja zewnątrzkomórkowego DNA, niszczenie struktury jądra komórkowego
Proteazy (np. proteaza IgA)	niszczenie zrębu białkowego tkanek, degradacja przeciwciał i białek bójczych
Fosfolipazy Streptolizyna O Leukocydyna Hemolizyny	działanie cytolityczne poprzez niszczenie struktury błony cytoplazmatycznej komórek eukariotycznych, w tym erytrocytów będących źródłem żelaza zwiększającego szanse bakterii na przeżycie
Fibrynolizyny (stafylokinaza, streptokinaza)	aktywacja proteaz oraz aktywacja plazminogenu do plazminy rozkładającej fibrynę i inne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej

Warto w tym miejscu nadmienić, że bakterie są w stanie syntetyzować nie tylko enzymy degradujące komórki i tkanki gospodarza, ale również białka o aktywności enzymatycznej, zdolne do inaktywacji antybiotyków stosowanych powszechnie w terapii przeciwbakteryjnej (m.in., beta-laktamazy, w tym penicylinazy, cefalosporiny, karbapenemy, unieczynnijące antybiotyki beta-laktamowe). Zagadnienia związane z lekoopornością bakterii, również o podłożu enzymatycznym, omówiono w poprzednim rozdziale monografii (Rozdział VI: Oporność bakterii na leki przeciwbakteryjne).

## Toksyny bakteryjne

Bakterie produkują wiele rozmaitych toksyn. Wśród nich wyróżnia się endotoksyny i egzotoksyny (Cavaillon, 2018).

Endotoksyny to komponenty ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. W przeciwieństwie do egzotoksyn nie są wydzielane poza komórkę prokariota (Cavaillon, 2018). Do endotoksyn należą niewrażliwe na ogrzewanie LPS i LOS. Endotoksyny dostają się do środowiska z powierzchni komórki bakteryjnej przez złuszczenie – dopiero w momencie jej śmierci (w wyniku zniszczenia czy rozpadu), jak również w trakcie podziału komórkowego. Głównym elementem aktywności biologicznej endotoksyny jest lipid A, który aktywuje układ odpornościowy gospodarza do silnej odpowiedzi obronnej. Pobudza wydzielanie przez komórki układu odpornościowego, głównie przez limfocyty T, dużych ilości mediatorów prozapalnych takich jak cytokiny (TNF-alfa – ang. *tumor necrosis factor*, IL-1 – ang. *interleukin*, IL-2, IL-6 – stąd możliwe jest wystąpienie zjawiska burzy cytokinowej), białka ostrej fazy, reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*, RNS), czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet-activating factor*, PAF) (Saluk-Juszczak, 2007). W trakcie ostrej infekcji ogólnoustrojowej taka silna reakcja zapalna może być bardzo niebezpieczna dla organizmu gospodarza, ponieważ wydzielane mediatory nie są swoiste dla drobnoustrojów, a ich duża ilość może niszczyć również komórki własne i tkanki makroorganizmu. Lawinowe uwalnianie mediatorów jest możliwe także wtedy, gdy w organizmie gospodarza nie ma już żywych patogenów, ale jest jeszcze ich endotoksyna. W konsekwencji mogą rozwinąć się nawet posocznica endotoksyczna i wstrząs septyczny, bezpośrednio zagrażające życiu (Tisoncik i in., 2012; Mallat i in., 2019; Fajgenbaum i June, 2020).

Egzotoksyny (ektotoksyny) to toksyny białkowe, uwalniane aktywnie, pozakomórkowo, zarówno przez bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne (Popoff, 2005). Wraz z płynami ustrojowymi gospodarza mogą przedostawać się w odległe miejsca makroorganizmu. Zazwyczaj są silnie immunogenne (wyraźnie pobudzają układ odpornościowy gospodarza), przez co mogą też wywoływać reakcje ogólnoustrojowe. Ze względu na te cechy są powszechnie wykorzystywane jako składniki szczepionek, jednak nie w postaci aktywnych biologicznie egzotoksyn, ale jako toksoidy (anatoksyny), czyli toksyny pozbawione – za pomocą związków chemicznych lub wysokiej temperatury – toksycznych właściwości. Geny, które kodują egzotoksyny, są zlokalizowane często na plazmidach lub bakteriofagach (Casas i Maloy, 2011). Przykładami toksyn kodowanych przez bakteriofagi DNA są: toksyna choleryczna, botulinowa i błonicza. Szczepy bakteryjne przenoszące faga są chorobotwórcze, a szczepy, których materiał genetyczny nie został zintegrowany z fagiem będącym nosicielem genów kodujących daną egzotoksynę, nie są patogenne.

Egzotoksyny są uwalniane przez komórki bakteryjne za pomocą wyspecjalizowanych struktur zwanych systemami sekrecyjnymi (wydzielniczymi) (Green i Mecsas, 2016). Niektóre z nich transportują egzotoksyny do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, inne mogą wprowadzać je do komórek gospodarza również w sposób bezpośredni. Jest to niezwykle korzystne dla patogenu z uwagi na ochronę toksyny przed przeciwciałami neutralizującymi, zwanymi antytoksynami. Jednym z ważniejszych bakteryjnych czynników wirulencji jest system sekrecyjny typu III (ang. *type III secretion system*, T3SS), nazywany iniektozosem, wykorzystywany przez niektóre bakterie Gram-ujemne. Jego elementy strukturalne przechodzą przez błonę zewnętrzną i cytoplazmatyczną Gram-ujemnej komórki bakteryjnej i działają na zasadzie tzw. strzykawki molekularnej, za pomocą której białko toksyny wytworzone przez drobnoustrój zostaje wprowadzone do wnętrza komórki gospodarza po bezpośrednim zetknięciu z jej błoną cytoplazmatyczną. Wykazano, że m.in. szczepy *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Shigella* spp., posiadające T3SS, są zdecydowanie bardziej zjadliwe niż te, które T3SS nie posiadają (Mota i in., 2005; Büttner, 2012).

Wyróżniono trzy typy egzotoksyn: toksyny dwuskładnikowe, superantygeny i cytolizyny.

Toksyny dwuskładnikowe to toksyny typu A-B (Lahiri, 2000; Alouf, 2000). Podjednostka B (ang. *binding*) wiąże się swoiście z receptorem obecnym na powierzchni komórki gospodarza – to, do której komórki się przyłączy, determinuje późniejsze biologiczne działanie egzotoksyny i objawy kliniczne. Podjednostka A (ang. *activity*), aktywna biologicznie część egzotoksyny, wnika do wnętrza komórki na drodze endocytozy i tam – po uwolnieniu do cytoplazmy – ulega aktywacji, co powoduje

określone działanie toksyczne. Egzotoksyny typu A-B są syntetyzowane zarówno przez bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne.

Superantygeny są wytwarzane głównie przez bakterie Gram-dodatnie. Są to białka, które wiążą się tylko z powierzchnią komórki gospodarza, nie wnikają do jej wnętrza. Oddziałują bardzo silnie immunogennie, aktywują niemal wszystkie limfocyty (głównie Limfocyty T) w sposób zarówno nieswoisty, poprzez wiązanie z regionami konserwatywnymi, niezmiennymi, receptorów limfocytów (TCR i BCR – odpowiednio: ang. *T cell receptor*, ang. *B cell receptor*), jak i nietypowo, bo z zewnętrzną powierzchnią cząsteczek MHC (ang. *major histocompatibility complex*) klasy II na komórkach prezentujących antygen (ang. *antigen-presenting cell*, APC), bez wstępnej obróbki antygeny. Konsekwencją jest masowe wydzielanie bardzo dużych ilości cytokin prozapalnych, które może doprowadzić do wstrząsu toksycznego, zagrażającego życiu (Bunker i in., 2019; Davies i in., 2019; Spaulding i in., 2013; Anderson i in., 2006).

Cytolizyny to toksyny niszczące integralność błony cytoplazmatycznej komórek gospodarza od zewnątrz, co prowadzi do ich lizy. Taką aktywność wykazuje np. lecytynaza, należąca do toksyn alfa (egzoenzymów) (Brosnahan i in., 2009).

W Tabeli 2 podano przykłady toksyn bakteryjnych oraz mechanizmy ich działania.

**Tabela 2.** Toksyny bakteryjne (Lahiri, 2000; Alouf, 2000).

Przykłady	Mechanizm działania
<b>Endotoksyny</b>	
LPS	silny aktywator wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza i czynnik wykrzepiania, lipid A endotoksyny posiada właściwości toksyczne
LOS	
<b>Egzotoksyny</b>	
Toksyna błonicza <sup>1</sup>	hamowanie syntezy białek
Egzotoksyna A <sup>1</sup>	
Toksyna Shiga <sup>1</sup>	
Toksyna tężcowa <sup>1</sup>	neurotoksyny, zaburzają funkcje neuronów, hamują przewodnictwo nerwowe
Toksyna botulinowa <sup>1</sup>	
Toksyna choleryczna <sup>1</sup>	hiperaktywacja komórek nabłonkowych (zaburzenie procesów regulatorowych komórki, wzrost stężenia cAMP – ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
Enterotoksyna ciepłowrażliwa LT <sup>1</sup>	
Enterotoksyna ciepłostała ST	
Toksyna krztuścowa <sup>1</sup>	
Pneumolizyna	
Enterotoksyna gronkowcowa	superantygeny, powodują hiperaktywację komórek układu odpornościowego (indukują nasiloną syntezę mediatorów prozapalnych)
Gronkowcowa toksyna wstrząsu toksycznego	
Paciorkowcowa toksyna wstrząsu toksycznego	
Toksyna pirogenna (erytrogena)	
Toksyna epidermolityczna (eksfoliatyna)	

<sup>1</sup>Toksyna typu A-B

## Siderofory

Do bakteryjnych czynników zjadliwości należą także siderofory, czyli wytwarzane i wydzielane przez prokarioty komponenty, będące nośnikami jonów żelaza. Żelazo w formie jonów żelazowych ( $\text{Fe}^{3+}$ ) jest niezbędne do wzrostu i funkcjonowania drobnoustrojów, ponieważ stanowi kluczowy element budowy cytochromów i innych enzymów. Ilość dostępnego dla bakterii żelaza w organizmie człowieka jest znikoma, gdyż większość tego pierwiastka związana jest z białkami takimi jak transferyna czy laktoferyna (Ganz, 2018).

Aby z ustroju gospodarza pozyskać żelazo, bakterie wytwarzają i uwalniają właśnie siderofory. Żelazo, przy udziale sideroforów, jest wychwytywane i chelatowane. Następnie siderofory wiążą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórki bakteryjnej i są aktywnie transportowane do jej wnętrza, gdzie żelazo może być odpowiednio spożytkowane przez drobnoustrój (Kramer i in., 2020). Przykładami sideroforów są aerobaktyna i enterobaktyna, wydzielane przez *Escherichia coli* (Garénaux i in., 2011; Grass, 2006), aerobaktyna produkowana przez *Klebsiella pneumoniae* (Russo i Marr, 2019) oraz piowerdyna syntetyzowana przez *Pseudomonas aeruginosa* (Griffin i in., 2004).

Patogenne *Neisseria* spp., tj. *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis*, nie wytwarzają sideroforów. Zamiast tego jako źródło żelaza wykorzystują białka gospodarza wysycone jonami żelaza – transferynę i laktoferynę. Mechanizm ten jest warunkowany ekspresją powierzchniowych receptorów przeznaczonych dla transferyny i laktoferyny – mikroorganizmy pozyskują żelazo w trakcie internalizacji receptora, do którego przyłączyły się białkowe nośniki tego pierwiastka w ustroju gospodarza (Rohde i Dyer, 2003).

## Wyspy patogenności

Geny kodujące czynniki wirulencji bakterii chorobotwórczych mogą występować na chromosomie bakteryjnym lub być składnikami ruchomych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, genomy bakteriofagów, transpozony koniugacyjne. Regiony wykazujące wysoką częstotliwość tych genów w chromosomie bakteryjnym nazywane są wyspami patogenności (ang. *pathogenicity islands*, PAIs). Są one charakterystyczne zarówno dla bakterii Gram-dodatnich (np. *Streptococcus pneumoniae*), jak i Gram-ujemnych (np. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp.). Są to regiony DNA do 200 kb, które często niosą kilka różnych genów wirulencji i mają specyficzne sekwencje, zlokalizowane na swoich końcach. Wyspy patogenności różnią się od reszty chromosomu bakteryjnego zawartością par GC (guanina, cytozyna), co ułatwia ich poziomą (horyzontalną) transmisję pomiędzy komórkami bakteryjnymi. Pozyskanie przez drobnoustrój wysp patogenności skutkuje jego zwiększoną zjadliwością (Hallstrom i McCormick, 2015).

## Mechanizmy unikania przez bakterie odpowiedzi immunologicznej

Oprócz wszystkich wyżej wymienionych czynników zjadliwości na patogenność bakterii składa się także szereg mechanizmów unikania przez nie wyspecjalizowanej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, która ma przecież na celu usunięcie obcych drobnoustrojów. Wiele mikroorganizmów prokariotycznych wykształciło sposoby, dzięki którym mogą wymknąć się spod immunologicznej kontroli gospodarza i nie tylko przetrwać (zakażenia utajone), ale również powodować ciężkie ostre lub przewlekłe infekcje.

Bakterie mogą wydzielać enzymy proteolityczne, jak np. proteazy serynowe, proteazy cysteinowe, metaloproteazy, rozkładające białka, będące elementem humoralnej odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej (Potempa i Potempa, 2012).

Na blokowanie aktywacji układu dopełniacza pozwala prokariotom wytwarzanie pewnych specyficznych molekuł – czy to związanych z komórką bakteryjną, czy też wydzielanych pozakomórkowo. Są to np. antygeny O-swoiste LPS, białko M obecne u *Streptococcus pyogenes*, poriny bakterii z gatunku *Neisseria gonorrhoeae* (Ermert i in., 2019).

Bakterie mogą zahamować chemotaksję fagocytów do miejsca objętego infekcją poprzez za-blokowanie receptorów dla cząsteczek adhezyjnych na leukocytach lub na powierzchni śródbłónka. Funkcję taką pełnią m.in. białko CHIPS (ang. *chemotaxis inhibitory protein*) bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus* oraz białka Eap i SSL-5 (ang. *staphylococcal superantigen-like protein*), występujące u gronkowców (Sadowska i Różalska, 2010; Helbin i in., 2012).

Zahamowaniu może też ulec proces rozpoznawania bakterii przez fagocyta, np. otoczki bakte-ryjne utrudniają receptorom TLR (ang. *Toll-like receptor*) na fagocytach dostęp do wzorców mole-kułarnych PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*). Otoczki są wytwarzane m.in. przez *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Klebsiella pneumoniae* i w przypadku tych bakterii stanowią niezwykle ważny czynnik wirulencji (Carruthers i in., 2007).

Znane jest również zjawisko blokowania lub osłabiania przez prokarioty fagocytozy zależnej od opsonin poprzez wiązanie fragmentu stałego Fc (ang. *crystallizable fragmet*) przeciwciał. Taką aktywność funkcjonalną wykazują np. białko A *Staphylococcus aureus*, białka M i G *Streptococcus pyogenes*, białko L *Peptostreptococcus magnus* (Falugi i in., 2013; Ghosh, 2011).

Mechanizm hamowania tworzenia fagosomu w fagocycie, poprzez depolimeryzację mikro-filamentów aktyny lub zdolność do ucieczki z fagosomu (czyli wodniczki trawiennej fagocyta) do cytoplazmy fagocyta (w wyniku lizy błony zamykającej fagosom), opisano np. dla *Listeria monocyto-genes*, *Shigella* spp. i *Rickettsia* spp. (Lampel i in., 2018; Pizarro-Cerdá i Cossart, 2018).

Hamowanie dojrzewania fagosomu i fuzji z lizosomami, w następstwie czego niemożliwe jest wewnątrzfagocytarne zabicie drobnoustroju, zaobserwowano m.in. w przypadku zakażeń o etiologii *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumo-niae*, *Nocardia* spp. Patogen chroni się we wnętrzu komórki gospodarza, będącej niczym koń trojań-ski (Mitchell i in., 2016). Patogeny wewnątrzkomórkowe posiadają zdolność blokowania apoptozy (m.in. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*) lub autofagii (*Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*) (Kotwal, 1997).

Gronkowcowa toksyna zespołu wstrząsu toksycznego oraz hemolizyna alfa mogą aktywować apoptozę fagocytów gospodarza (Häcker, 2018).

Wiele gatunków bakterii tlenowych i względnie beztlenowych syntetyzuje enzymy anty-oksydacyjne (np. katalazę, dysmutazy ponadtlenkowe), hamujące powstawanie wolnych rodników tlenowych lub neutralizujące je. Także wytwarzane przez niektóre prokarioty barwniki pełnią funk-cje antyoksydacyjne (np. barwniki karotenoidowe u *Staphylococcus aureus*, barwniki fenazykowe u *Pseudomonas aeruginosa*, barwniki porfirykowe u *Porphyromonas* spp., pochodne ornityny u pa-cjorkowców grupy B).

Pewne enzymy bakteryjne, np. DNazy i proteazy, umożliwiają drobnoustrojom uwolnienie się i ucieczkę z sieci NETs (ang. *neutrophil extracellular traps*), formowanych głównie przez neutrofile (Martinez i in., 2019; Kamoshida i in., 2015).

Ogromną rolę w patogenezie zakażeń odgrywa zmienność antygenowa mikroorganizmów, tak wirusowych (np. wirus grypy, wirus HIV, SARS-CoV-2), jak i bakteryjnych (Azarian i in., 2018; Kohler i in., 2016). Drobnoustroje zmienione pod względem antygenowym są rozpoznawane przez układ immunologiczny gospodarza jako zupełnie nowe, nieznanne dotąd, przez co odpowiedź swoista, za-miast być szybsza i sprawniejsza przy kolejnym kontakcie z patogenem, znów trwa tak samo długo, jak gdyby był to pierwszy kontakt.

Mimikra antygenowa to z kolei upodabnianie się powierzchniowych struktur bakteryjnych do antygenów gospodarza (np. kwas sjałowy otoczek *Neisseria meningitidis* jest podobny do reszt kwasu sjałowego na komórkach mózgu) (Harvey i in., 2001).

## Bibliografia

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. 2015. *Immunologia. Funkcje i zaburzenia układu immunologicznego*, wyd. 1. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- Alley T.L., Keller C.C., Moscatello K. 2018. *USMLE step 1 lecture notes 2018: Immunology and Microbiology*. Kaplan Medical, Nowy Jork.
- Alouf J.E. 2000. Bacterial protein toxins. An overview. *Methods in Molecular Biology* 145, str. 1–26.  
DOI: [10.1385/1-59259-052-7:1](https://doi.org/10.1385/1-59259-052-7:1).
- Anderson A.L., Sporici R., Lambris J., Larosa D., Levinson A.I. 2006. Pathogenesis of B-cell superantigen-induced immune complex-mediated inflammation. *Infection and Immunity* 74(2), str. 1196–1203.  
DOI: [10.1128/IAI.74.2.1196-1203.2006](https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1196-1203.2006).
- Arpigny J.L., Jaeger K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* 343, str. 177–183. Dostępne online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220539/pdf/10493927.pdf> (dostęp: 15.07.2022).
- Azarian T., Mitchell P.K., Georgieva M., Thompson C.M., Ghouila A., Pollard A.J., von Gottberg A., du Plessis M., Antonio M., Kwambana-Adams B.A., Clarke S., Everett D., Cornick J., Sadowy E., Hryniowicz W., Skoczynska A., Moisi J.C., McGee L., Beall B., Metcalf B.J., Breiman R.F., Ho P., Reid R., O'Brien K.L., Gladstone R. A., Bentley S.D., Hanage W.P. 2018. Global emergence and population dynamics of divergent serotype 3 CC180 pneumococci. *PLoS Pathogens* 14(11), nr art. e1007438.  
DOI: [10.1371/journal.ppat.1007438](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007438).
- Bigos M., Bielec F., Kiryszewska-Jesionek A., Kuczyńska A., Łysakowska M., Schmidt M., Szczerba I., Zarzycka B., Żurawska-Olszewska J., Pastuszek-Lewandoska D. 2022. *Bakteriologia medyczna – najważniejsze patogeny*. Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź.  
Dostępne online: <https://cybra.lodz.pl/dlibra/publication/24491/edition/21170/content.pl> (dostęp: 21.10.2022).
- Brosnahan A.J., Mantz M.J., Squier C.A., Peterson M.L., Schlievert P.M. 2009. Cytolysins augment superantigen penetration of stratified mucosa. *Journal of Immunology* 182(4), str. 2364–2373.  
DOI: [10.4049/jimmunol.0803283](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803283).
- Bryniarski K. 2018. *Immunologia*, wyd. 1. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- Bunker J.J., Drees C., Watson A.R., Plunkett C.H., Nagler C.R., Schneewind O., Eren A.M., Bendelac A. 2019. B cell superantigens in the human intestinal microbiota. *Science Translational Medicine* 11(507).  
DOI: [10.1126/scitranslmed.aau9356](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau9356).
- Büttner D. 2012. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(2), str. 262–310. DOI: [10.1128/MMBR.05017-11](https://doi.org/10.1128/MMBR.05017-11).
- Cardona P.J. 2018. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica (English Edition)* 36(1), str. 38–46. DOI: [10.1016/j.eimc.2017.10.015](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.015).
- Carruthers V.B., Cotter P.A., Kumamoto C.A. 2007. Microbial pathogenesis: mechanisms of infectious disease. *Cell Host and Microbe* 2(4), str. 214–219. DOI: [10.1016/j.chom.2007.09.007](https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.007).
- Casas V., Maloy S. 2011. Role of bacteriophage-encoded exotoxins in the evolution of bacterial pathogens. *Future Microbiology* 6(12), str. 1461–1473. DOI: [10.2217/fmb.11.124](https://doi.org/10.2217/fmb.11.124).
- Cavaillon J.M. 2018. Exotoxins and endotoxins: inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon* 149, str. 45–53.  
DOI: [10.1016/j.toxicon.2017.10.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.016).
- Cornelissen C.N., Fisher B.D., Harvey R.A. 2013. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*, wyd. 3. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.
- Costerton J.W., Montanaro L., Arciola C.R. 2007. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. *International Journal of Artificial Organs* 30(9), str. 757–763.  
DOI: [10.1177/039139880703000903](https://doi.org/10.1177/039139880703000903).
- Davies F.J., Olme C., Lynskey N.N., Turner C.E., Sriskandan S. 2019. Streptococcal superantigen-induced expansion of human tonsil T cells leads to altered T follicular helper cell phenotype, B cell death and reduced immunoglobulin release. *Clinical and Experimental Immunology* 197(1), str. 83–94.  
DOI: [10.1111/cei.13282](https://doi.org/10.1111/cei.13282).
- Ermert D., Ram S., Laabei M. 2019. The hijackers guide to escaping complement: lessons learned from pathogens. *Molecular Immunology* 114, str. 49–61. DOI: [10.1016/j.molimm.2019.07.018](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.07.018).

- Fajgenbaum D.C., June C.H. 2020. Cytokine storm. *New England Journal of Medicine* 383(23), str. 2255–2273. DOI: [10.1056/NEJMra2026131](https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131).
- Falugi F., Kim H.K., Missiakas D.M., Schneewind O. 2013. Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio* 4(5), nr art. e00575-13. DOI: [10.1128/mBio.00575-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00575-13).
- Flores-Díaz M., Monturiol-Gross L., Naylor C., Alape-Girón A., Flieger A. 2016. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(3), str. 597–628. DOI: [10.1128/MMBR.00082-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15).
- Ganz T. 2018. Iron and infection. *International Journal of Hematology* 107(1), str. 7–15. DOI: [10.1007/s12185-017-2366-2](https://doi.org/10.1007/s12185-017-2366-2).
- Garénaux A., Caza M., Dozois C.M. 2011. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 153(1–2), str. 89–98. DOI: [10.1016/j.vetmic.2011.05.023](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.023).
- Getahun H., Matteelli A., Chaisson R.E., Raviglione M. 2015. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *New England Journal of Medicine* 372(22), str. 2127–2135. DOI: [10.1056/NEJMra1405427](https://doi.org/10.1056/NEJMra1405427).
- Ghosh P. 2011. The nonideal coiled coil of M protein and its multifarious functions in pathogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 715, str. 197–211. DOI: [10.1007/978-94-007-0940-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_12).
- Grass G. 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* 19(2), str. 159–172. DOI: [10.1007/s10534-005-4341-2](https://doi.org/10.1007/s10534-005-4341-2).
- Green E.R., Meccas J. 2016. Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology Spectrum* 4(1). DOI: [10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015).
- Griffin A.S., West S.A., Buckling A. 2004. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* 430(7003), str. 1024–1027. DOI: [10.1038/nature02744](https://doi.org/10.1038/nature02744).
- Häcker G. 2018. Apoptosis in infection. *Microbes and Infection* 20(9–10), str. 552–559. DOI: [10.1016/j.micinf.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.10.006).
- Hallstrom K.N., McCormick B.A. 2015. Pathogenicity islands: origins, structure, and roles in bacterial pathogenesis. W: Tang Y.W., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. *Molecular Medical Microbiology*, wyd. 2. DOI: [10.1016/B978-0-12-397169-2.00016-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00016-0).
- Harvey H.A., Swords W.E., Apicella M.A. 2001. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic neisseria and haemophilus. *Journal of Autoimmunity* 16(3), str. 257–262. DOI: [10.1006/jaut.2000.0477](https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0477).
- Helbin W.M., Polakowska K., Międzobrodzki J. 2012. Czynniki wirulencji *Staphylococcus aureus* zależne od bakteriofagów. *Postępy Mikrobiologii* 51(4), str. 291–298.
- Kamoshida G., Kikuchi-Ueda T., Tansho-Nagakawa S., Nakano R., Nakano A., Kikuchi H., Ubagai T., Ono Y. 2015. *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). *Journal of Infection and Chemotherapy* 21(1), str. 43–49. DOI: [10.1016/j.jiac.2014.08.032](https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.032).
- Kohler S., Voß F., Gómez Mejía A., Brown J.S., Hammerschmidt S. 2016. Pneumococcal lipoproteins involved in bacterial fitness, virulence, and immune evasion. *FEBS Letters* 590(21), str. 3820–3839. DOI: [10.1002/1873-3468.12352](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12352).
- Kotwal G.J. 1997. Microorganisms and their interaction with the immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 62(4), str. 415–429. DOI: [10.1002/jlb.62.4.415](https://doi.org/10.1002/jlb.62.4.415).
- Kramer J., Özkaya Ö., Kümmerli R. 2020. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews. Microbiology* 18(3), str. 152–163. DOI: [10.1038/s41579-019-0284-4](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4).
- Lahiri S.S. 2000. Bacterial toxins – an overview. *Journal of Natural Toxins* 9(4), str. 381–408.
- Lampel K.A., Formal S.B., Maurelli A.T. 2018. A Brief History of *Shigella*. *EcoSal Plus* 8(1). DOI: [10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2017](https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2017).
- Lazar V. 2011. Quorum sensing in biofilms – how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe* 17(6), str. 280–285. DOI: [10.1016/j.anaerobe.2011.03.023](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.023).
- Lewinson W. 2014. *Review of Medical Microbiology and Immunology*, wyd. 13. McGraw-Hill Medical, Nowy Jork.
- Magana M., Sereti C., Ioannidis A., Mitchell C.A., Ball A.R., Magiorkinis E., Chatzipanagiotou S., Hamblin M.R., Hadjifrangiskou M., Tegos G.P. 2018. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews* 31(3), nr art. e00084-16. DOI: [10.1128/CMR.00084-16](https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16).



- Mallat J., Leone S., Cascella M., Fiore M. 2019. Should endotoxin be a research priority in Gram-negative sepsis and septic shock? *Expert Review of Clinical Pharmacology* 12(8), str. 697–699.  
DOI: [10.1080/17512433.2019.1627871](https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1627871).
- Martinez P.J., Farhan A., Mustafa M., Javid N., Darkoh C., Garrido-Sanabria E., Fisher-Hoch S.P., Briles D.E., Kantarci A., Mirza S. 2019. PspA facilitates evasion of pneumococci from bactericidal activity of neutrophil extracellular traps (NETs). *Microbial Pathogenesis* 136, nr art. 103653.  
DOI: [10.1016/j.micpath.2019.103653](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103653).
- Mattei P.L., Beachkofsky T.M., Gilson R.T., Wisco O.J. 2012. Syphilis: a reemerging infection. *American Family Physician* 86(5), str. 433–440.
- Mayer F. 1993. Principles of functional and structural organization in the bacterial cell: 'compartments' and their enzymes. *FEMS Microbiology Reviews* 10(3–4), str. 327–345.  
DOI: [10.1111/j.1574-6968.1993.tb05874.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05874.x).
- Mitchell G., Chen C., Portnoy D.A. 2016. Strategies used by bacteria to grow in macrophages. *Microbiology Spectrum* 4(3), nr art. 10.1128. DOI: [10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015).
- Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A. 2002. Wyspy patogenności. *Postępy Mikrobiologii* 41(1), str. 51–69.
- Mota L.J., Journet L., Sorg I., Agrain C., Cornelis G.R. 2005. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* 307(5713), nr art. 1278. DOI: [10.1126/science.1107679](https://doi.org/10.1126/science.1107679).
- Mukherjee S., Bassler B.L. 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews. Microbiology* 17(6), str. 371–382. DOI: [10.1038/s41579-019-0186-5](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5).
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2014. *Mikrobiologia*, wyd. 8. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- Pizarro-Cerdá J., Cossart P. 2018. *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth. *Microbiology Spectrum* 6(6). DOI: [10.1128/microbiolspec.GPP3-0013-2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0013-2018).
- Popoff M.R. 2005. Bacterial exotoxins. *Contributions to Microbiology* 12, str. 28–54.  
DOI: [10.1159/000081688](https://doi.org/10.1159/000081688).
- Potempa M., Potempa J. 2012. Protease-dependent mechanisms of complement evasion by bacterial pathogens. *Biological Chemistry* 393(9), str. 873–388. DOI: [10.1515/hsz-2012-0174s](https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0174s).
- Ramasamy M., Lee J. 2016. Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. *BioMed Research International* 2016, nr art. 1851242.  
DOI: [10.1155/2016/1851242](https://doi.org/10.1155/2016/1851242).
- Rohde K.H., Dyer D.W. 2003. Mechanisms of iron acquisition by the human pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Frontiers in Bioscience* 8, str. d1186–1218. DOI: 10.2741/1133.
- Russo T.A., Marr C.M. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews* 32(3), nr art. e00001-19. DOI: [10.1128/CMR.00001-19](https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19).
- Sadowska B., Różalska B. 2010. Gronkowce – na co jeszcze je stać? *Postępy Mikrobiologii* 49(3), str. 173–178.
- Heczko P.B., Pietrzyk A., Wróblewska M. 2015. *Mikrobiologia lekarska*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Saluk-Juszczak J. 2007. Znaczenie lipopolisacharydu bakteryjnego w procesie aktywacji płytek krwi. *Postępy Biologii Komórki* 3 (1), str. 159–172.
- Spaulding A.R., Salgado-Pabón W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y.M., Schlievert P.M. 2013. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 26(3), str. 422–447. DOI: [10.1128/CMR.00104-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00104-12).
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1), str. 16–32. DOI: [10.1128/MMBR.05015-11](https://doi.org/10.1128/MMBR.05015-11).

