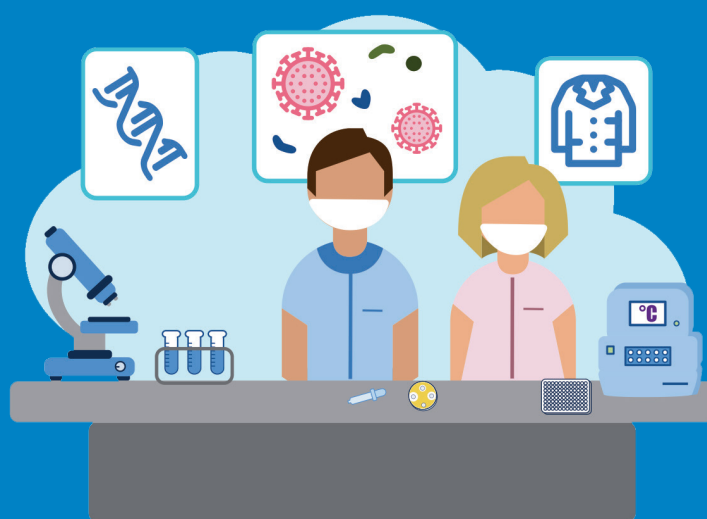


JUSTYNA AGIER, ALEKSANDRA GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA,
ELŻBIETA KOZŁOWSKA, DAGMARA SZMAJDA-KRYGIER,
MAGDALENA JURCZAK, MARTA KĘDZIERSKA,
PAULINA ŻELECHOWSKA

WYBRANE ASPEKTY DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ Z ELEMENTAMI MONITOROWANIA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKCJI ŻYWNOSCI



JUSTYNA AGIER^{1*} , ALEKSANDRA GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA^{1*} ,
ELŻBIETA KOZŁOWSKA¹ , DAGMARA SZMAJDA-KRYGIER² ,
MAGDALENA JURCZAK¹ , MARTA KĘDZierska¹ ,
PAULINA ŻELECHOWSKA¹ 

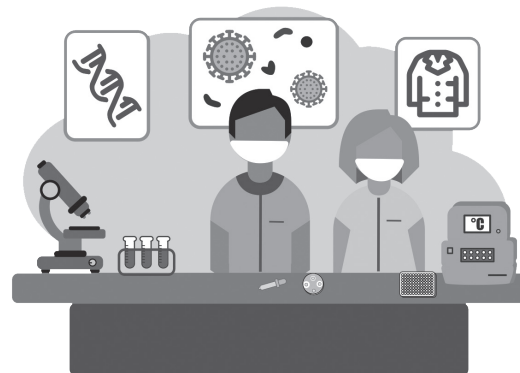
WYBRANE ASPEKTY DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ Z ELEMENTAMI MONITOROWANIA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKCJI ŻYWNOŚCI

SELECTED ASPECTS OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS
WITH ELEMENTS OF FOOD PRODUCTION
SAFETY MONITORING

¹ Zakład Mikrobiologii, Genetyki i Immunologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

* justyna.agier@umed.lodz.pl, aleksandra.goralczyk-binkowska@umed.lodz.pl



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.; tekst jednolity: Dz.U. 2022 poz. 661).

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

dr hab. Małgorzata Pikala, prof. uczelni

REDAKCJA JĘZYKOWA

Magdalena Kokosińska

KOREKTA

Magdalena Zagrobelna

OPRACOWANIE GRAFICZNE

Tomasz Przybył

**WYBRANE ASPEKTY DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ
Z ELEMENTAMI MONITOROWANIA BEZPIECZEŃSTWA PRODUKCJI ŻYWNOSCI**
Łódź 2025

WYDAWNICTWO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

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

e-mail: 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 978-83-67198-56-1

WYDANIE PIERWSZE



© 2025. 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

Wprowadzenie.....	9
1. Pobranie materiału klinicznego do badań mikrobiologicznych. Badanie mikroskopowe bakterii.....	11
1.1. Zlecenie (skierowanie) badania mikrobiologicznego.....	11
1.2. Pobranie i transport materiału do badań mikrobiologicznych.....	11
1.2.1. Zasady ogólne.....	11
1.2.2. Zasady szczegółowe.....	14
1.3. Obserwacja mikroskopowa	19
2. Morfologia i fizjologia bakterii.	21
2.1. Klasyfikacja i nazewnictwo bakterii.....	21
2.2. Budowa strukturalna komórki bakteryjnej	22
2.2.1. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych	24
2.2.2. Budowa ściany komórkowej bakterii kwasopornych	25
2.3. Metody wizualizacji komórek bakterii i ich struktur	25
2.3.1. Barwienie Grama.....	26
2.3.2. Barwienie Burri-Ginsa.....	26
2.3.3. Barwienie Writza/Schaeffera-Fultona.....	27
2.3.4. Barwienie Doernera	27
2.3.5. Barwienie Neissera	27
2.3.6. Barwienie Ziehla-Neelsena	27
2.3.7. Barwienie Loefflera	27
2.4. Morfologia bakterii	28
2.4.1. Formy kuliste	28
2.4.2. Formy walcowate (cyldryczne).....	30
2.4.3. Formy spiralne/skręcone.....	32
2.4.4. Inne formy	33
3. Hodowle mikroorganizmów.....	35
3.1. Zakładanie hodowli drobnoustrojów	35
3.2. Podłoża mikrobiologiczne	36
4. Testy biochemiczne. Metody oceny lekowrażliwości	39
4.1. Analiza biochemiczna.....	39
4.2. Ocena lekowrażliwości	39
5. Morfologia grzybów mikroskopowych. Diagnostyka mykologiczna	43
5.1. Charakterystyka grzybów mikroskopowych.....	43
5.2. Grzyby mikroskopowe jako czynniki etiologiczne chorób infekcyjnych.....	44
5.3. Metody identyfikacji grzybów w materiałach biologicznych	46

6. Zasady i aspekty prawne mikrobiologicznej analizy żywności. Analiza mikrobiologiczna produktów spożywczych. Część I.....	47
6.1. Mikroflora surowców i produktów spożywczych.....	47
6.2. Analiza drobnoustrojów w żywności.....	48
7. Analiza mikrobiologiczna produktów spożywczych. Część II	50
7.1. Źródła mikrobiologicznego zanieczyszczenia żywności.....	50
7.2. Utrwalanie żywności	50
8. Mikroorganizmy w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym.	
Eliminacja drobnoustrojów.....	52
8.1. Mikrobiologia przemysłowa	52
8.2. Procesy prowadzące do usunięcia czynników mikrobiologicznych.....	53
8.2.1. Metody chemiczne dezynfekcji	54
8.2.2. Metody fizyczne dezynfekcji	55
8.2.3. Metody mechaniczne dezynfekcji	55
8.2.4. Metody sterylizacji wysokotemperaturowej.....	56
8.2.5. Metody sterylizacji niskotemperaturowej	56
9. Nowoczesne techniki wykorzystywane w diagnostyce mikrobiologicznej. Diagnostyka wirusologiczna	57
9.1. Narzędzia biologii molekularnej.....	57
9.2. Diagnostyka/badanie mikrobioty jelitowej	57
9.3. Cytometria przepływowa	58
9.4. Szybkie testy diagnostyczne.....	58
9.5. Diagnostyka wirusologiczna	59
Bibliografia.....	60

Streszczenie: Praca to kompendium wiedzy o podstawach mikrobiologii ze szczególnym naciskiem na aspekty mikrobiologii lekarskiej oraz przemysłowej przeznaczone dla studentów uczelni o profilu medycznym i biologicznym, a także pasjonatów tej dyscypliny, nauczycieli i pracowników laboratoriów oraz przemysłu. W opracowaniu uwzględniono najważniejsze zagadnienia dotyczące pobierania materiałów klinicznych do badań mikrobiologicznych oraz dalszych etapów diagnostyki zakażeń / chorób zakaźnych człowieka. Ponadto w opracowaniu przedstawiono standardy analizy mikrobiologicznej zarówno przestrzeni produkcyjnych, surowców, jak i gotowych do spożycia produktów żywnościowych.

Słowa kluczowe: mikrobiologia, bakterie, wirusy, grzyby mikroskopowe, diagnostyka laboratoryjna

Abstract: A comprehensive compendium of fundamental microbiology knowledge, with particular emphasis on medical and industrial microbiology, intended for students of medical and biological universities, as well as enthusiasts, educators, laboratory and industry professionals. The course-book covers key elements of clinical sample collection for microbiological testing and subsequent stages of diagnosing pathogen-caused human infections. It also provides guidelines for microbial analyses of food production areas, raw ingredients, and final products.

Keywords: microbiology, bacteria, viruses, microscopic fungi, laboratory diagnostics

Wykaz skrótów

- AIDS** – nabyty niedobór odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)
- ATCC** – Amerykańska Kolekcja Typowych Kultur Mikroorganizmów (ang. *American Type Culture Collection*)
- ATP** – adenozy-no-5'-trifosforan
- BAL** – popłuczyny pęcherzykowo – oskrzelowe (ang. *bronchoalveolar lavage*)
- CFU** – jednostka tworząca kolonię (ang. *colony forming unit*)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy
- DTP** – szczepionka przeciw błonicy, tężcowi i krztuścowi (łac. *diphtheria, tetanus, pertussis*)
- ELISA** – test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- E-TEST** – ang. Epsilonometer test
- EUCAST** – Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *European Committee for Anti-microbial Susceptibility Testing*)
- HAV** – wirus zapalenia wątroby typu A (ang. *hepatitis A virus*)
- HEV** – wirus zapalenia wątroby typu E (ang. *hepatitis E virus*)
- HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)
- ICSP** – Międzynarodowy Komitet Systematyki Prokaryotów (ang. *International Committee on Systematics of Prokaryotes*)
- LPS** – lipopolisacharyd
- MBC** – minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. *minimum bactericidal concentration*)
- MFC** – minimalne stężenie grzybobójcze (ang. *minimum fungal concentration*)
- MIC** – minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*)
- MPC** – stężenie leku hamujące powstanie mutacji drobnoustrojów (ang. *mutant prevention concentration*)
- NAD⁺** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona)
- NPL** – najbardziej prawdopodobna liczba drobnoustrojów
- OUN** – ośrodkowy układ nerwowy
- PMR** – płyn mózgowo-rdzeniowy
- RTG** – rentgen
- TE** – tlenek etylenu
- TSST** – toksyna wstrząsu toksycznego (ang. *toxic shock syndrome toxin*)
- UHT** – sterylizacja błyskawiczna wysoką temperaturą (ang. *ultra high temperature*)
- USG** – ultrasonografia
- WE** – Wspólnota Europejska
- WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)
- ZOMR** – zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych
- ZUM** – zakażenie układu moczowego

Wprowadzenie

*The role of infinitely small in nature is infinitely large...*¹

Słowa te, wypowiedziane przez Ludwika Pasteura, francuskiego pioniera mikrobiologii, doskonale oddają istotę mikroświata, który – choć niewidoczny gołym okiem – ma ogromny wpływ na życie na Ziemi. Obecnie zakłada się, że pierwsze drobnoustroje pojawiły się na zielonej planecie około 3,5 miliarda lat temu. Były to proste organizmy jednokomórkowe, jednak zdolne do przetrwania w ekstremalnych warunkach, które ówczesznie panowały – wysokiej temperaturze, braku tlenu, atmosferze oraz intensywnym promieniowaniu UV i dużej aktywności wulkanicznej. Najstarsze ślady mikroorganizmów odkryto w postaci skamieniałości, stromatolitów – struktur utworzonych przez kolonie cyjanobakterii, które były jednymi z pierwszych organizmów fotosyntetyzujących.

Mikroorganizmy towarzyszą człowiekowi i innym organizmom od zarania dziejów, a wiele z nich pełni niezwykle pożyteczne funkcje w środowisku. Uczestniczą one w obiegu pierwiastków, biorą udział w procesach rozkładu materii organicznej, wiążą azot atmosferyczny, umożliwiają fermentację czy wspomagają fotosyntezę. Dzięki nim możliwe jest naturalne oczyszczanie środowisk oraz utrzymanie równowagi w ekosystemach wodnych i lądowych. Mikroorganizmy są również nieodzownym elementem zdrowia i funkcjonowania organizmów wyższych – w tym ludzi. Mikrobiota jelitowa, czyli zespół mikroorganizmów bytujących w przewodzie pokarmowym, odgrywa fundamentalną rolę w procesach trawienia, syntezie niektórych witamin, regulacji układu odpornościowego i ochronie przed patogenami. Obecność pożytecznych bakterii na skórze i błonach śluzowych pomaga utrzymać fizjologiczną równowagę i stanowi naturalną barierę przed infekcjami. Niemniej ważna jest rola drobnoustrojów w procesie produkcji żywności, zwłaszcza w kontekście fermentacji, poprawy wartości odżywczych oraz kształtowania cech sensorycznych produktów. Mikroorganizmy wykorzystywane w technologii żywności są nieodłącznym elementem wielu tradycyjnych i nowoczesnych procesów spożywczych, umożliwiają powstawanie produktów o wyjątkowych właściwościach smakowych, zapachowych i zdrowotnych.

Niemniej wśród ogromnej puli mikroorganizmów znajdują się również takie, które mogą oddziaływać niekorzystnie. To patogeny, czyli drobnoustroje chorobotwórcze, których obecność może prowadzić nie tylko do poważnych chorób u ludzi, zwierząt i roślin, ale również zaburzać równowagę całych ekosystemów. Patogeny mogą zakłócać funkcjonowanie łańcuchów troficznych, wpływać na populacje kluczowych gatunków, a tym samym zmieniać dynamikę środowiska naturalnego. Odrębną kwestią jest również zagadnienie związane z bezpieczeństwem, trwałością oraz higieną produktów spożywczych. Obecność patogenów w procesie produkcyjnym wpływa niekorzystnie na jakość żywności i prowadzi do jej niszczenia.

Dlatego też poznanie i zrozumienie społeczności drobnoustrojów ma kluczowe znaczenie – pozwala nie tylko na korzystanie z dobrodziejstw mikroświata, ale także na skuteczne przeciwdziałanie mikroorganizmom chorobotwórczym. W związku z tym niniejsza publikacja została poświęcona poznaniu najważniejszych dla człowieka mikroorganizmów, wywodzących się z trzech głównych grup: bakterii, grzybów i wirusów. Niniejsze opracowanie w syntetyczny sposób prowadzi czytelnika przez najważniejsze aspekty identyfikacji mikroorganizmów oraz opisuje ich znaczenie w procesie produkcji żywności.

Rozdział 1 jest poświęcony zasadom pobierania materiału klinicznego do badań mikrobiologicznych, co jest pierwszym i jednym z najważniejszych kroków w diagnostyce zakażeń. Podkreślono tu znaczenie odpowiedniego doboru metody pobrania, zachowania sterylności, czasu transportu do laboratorium oraz warunków przechowywania prób biologicznych. Omówione zostały m.in. zasady pobierania wymazów, krwi, moczu czy płwociny. Rozdział 2 skupia się na analizie mikroskopowej, która stanowi szybki i cenny etap wstępnej identyfikacji patogenu. Przedstawiono różne techniki barwienia, w tym barwienie metodą Grama umożliwiające podstawową identyfikację morfologiczną. Rozdział 3 opisuje klasyczne metody hodowli bakteryjnych prowadzonych na odpowiednich

¹*Rola nieskończenie małego w naturze jest nieskończenie wielka...* – tłumaczenie cytatu Ludwika Pasteura z języka angielskiego.

podłożach mikrobiologicznych. Przedstawiono różnice między pożywkami wybiórczymi, różnicującymi i wzbogaconymi oraz wskazano, jak dobrać podłoże do rodzaju materiału biologicznego i podejrzewanego patogenu. Omówiono także warunki inkubacji (temperatura, czas) oraz sposoby interpretacji wzrostu kolonii bakteryjnych – ich morfologii, barwy, zapachu czy zdolności do wywoływania hemolizy. Rozdział 4 poświęcono ocenie lekowrażliwości wyizolowanych szczepów, która ma kluczowe znaczenie w doborze skutecznej terapii przeciwbakteryjnej. Opisano standardowe metody oznaczania wrażliwości *in vitro*, takie jak metoda dyfuzyjno-krążkowa, oznaczanie MIC (minimalnego stężenia hamującego) oraz wykorzystanie automatycznych systemów diagnostycznych. Rozdział 5 został w całości poświęcony diagnostyce mykologicznej, czyli badaniom ukierunkowanym na wykrycie i identyfikację grzybów mikroskopowych w materiałach klinicznych. Omówiono zarówno drożdżaki, jak i grzyby pleśniowe, podkreślono przy tym znaczenie ich różnicowania w kontekście diagnostyki zakażeń oportunistycznych, często występujących u pacjentów z obniżoną odpornością. Z uwagi na to, że monografia skierowana jest do osób, które są zainteresowane procesami produkcji spożywczej, rozdziały 6 i 7 koncentrują się na zagadnieniach z zakresu mikrobiologii żywności. W rozdziale 6 omówiono rolę mikroorganizmów w produkcji żywności, zarówno tych pożytecznych – wykorzystywanych w fermentacji i poprawie jakości produktów – jak i tych szkodliwych, które mogą prowadzić do psucia się żywności lub stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. W rozdziale 7 szczególny nacisk położono na czynniki mikrobiologiczne zaburzające procesy technologiczne w produkcji żywności, m.in. niewłaściwą higienę produkcji. Rozdział 8 porusza praktyczne aspekty ograniczania liczby drobnoustrojów w przestrzeni produkcyjnej oraz w placówkach ochrony zdrowia, gdzie obecność mikroorganizmów chorobotwórczych może prowadzić do groźnych zakażeń szpitalnych i skażenia produktów spożywczych. Przedstawiono tu m.in. metody dezynfekcji i sterylizacji, zasady higieny personelu i powierzchni, a także systemy kontroli czystości mikrobiologicznej, stosowane w przemyśle spożywczym i medycynie. Ostatni rozdział został poświęcony nowoczesnym technikom stosowanym w mikrobiologii, które coraz częściej uzupełniają lub zastępują metody klasyczne. Omówiono podstawy diagnostyki wirusologicznej (w tym metody molekularne) oraz inne innowacyjne rozwiązania wykorzystywane w laboratoriach mikrobiologicznych.

Wyrażamy głęboką nadzieję, że monografia, którą oddajemy w Państwa ręce, będzie przystępna i pozwoli zrozumieć najważniejsze aspekty z zakresu mikrobiologii. Tematyka tej dyscypliny jest niezwykle obszerna, zatem niech przedstawione treści staną się punktem wyjścia do dalszych poszukiwań. Zachęcamy Państwa do zgłębiania wiedzy poprzez skorzystanie z dodatkowej literatury i rekomendowanych źródeł informacji, które umożliwią jeszcze pełniejsze zrozumienie złożoności omawianej tematyki. Pozostajemy otwarte na propozycje zmian w tekście, dzięki czemu będziemy mogli udoskonalić go w przyszłych latach dla kolejnych adeptów tej nauki.

Autorki

1. Pobranie materiału klinicznego do badań mikrobiologicznych. Badanie mikroskopowe bakterii

W tym rozdziale omówiono tok diagnostyki mikrobiologicznej poczynając od zlecenia badania, przez pobranie, po transport materiału klinicznego do laboratorium. Przedstawiono także jeden z etapów analizy materiału pod kątem obecności w nim komórek bakterii, tj. wykonanie preparatu mikroskopowego.

Choroby zakaźne (choroby infekcyjne, infekcje) człowieka to choroby wywołane przez mikroorganizmy patogenne (w tym bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty), ich toksyczne produkty, a także przez inne biologiczne czynniki chorobotwórcze (priony), które ze względu na charakter i sposób transmisji stanowią zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Choroby infekcyjne mogą szerzyć się różnymi drogami, m.in. przez kontakt bezpośredni, drogą kropelkową, drogą pokarmową, poprzez kontakt seksualny, drogą krwi, a także przez owady, które pełnią rolę wektorów. Podstawą właściwego rozpoznania choroby zakaźnej jest diagnostyka mikrobiologiczna. Jej tok jest zależny od podejrzanego czynnika etiologicznego, a przykładowy przedstawiono na rycinie 1. **Sposób zlecenia, pobierania i transportowania materiałów do badań mikrobiologicznych ma istotne znaczenie w uzyskiwaniu wyników o prawidłowej wartości diagnostycznej.** Dlatego ważne jest określenie zasad postępowania podczas poszczególnych etapów fazy przedanalizy w celu uniknięcia tzw. błędów przedlaboratoryjnych (Guder i in., 2012).

1.1. Zlecenie (skierowanie) badania mikrobiologicznego

Jakie informacje musi zawierać poprawnie przygotowane zlecenie badania laboratoryjnego (ryc. 2)? Te informacje można znaleźć na stronie 3 w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 5 września 2019 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych.

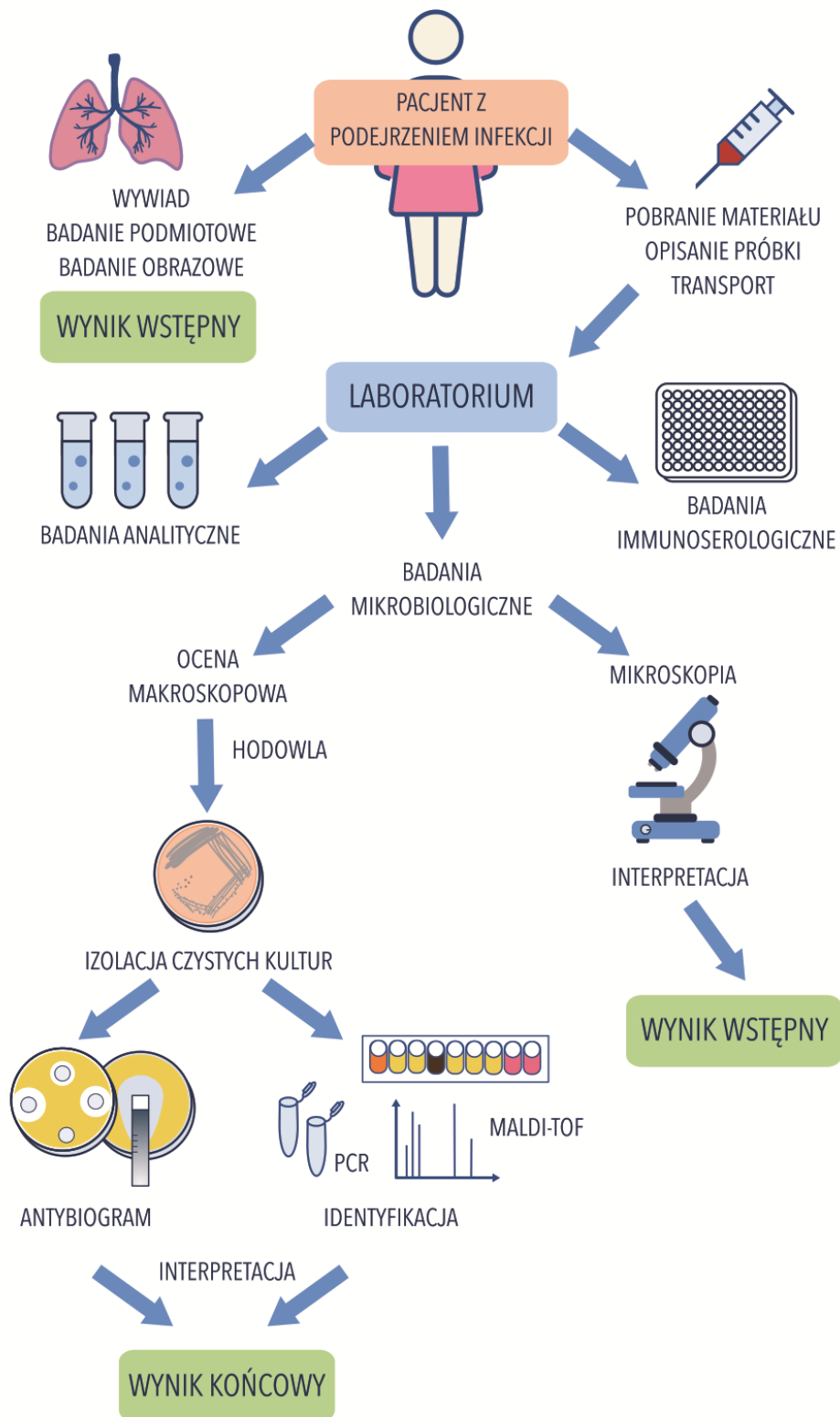
1.2. Pobranie i transport materiału do badań mikrobiologicznych

1.2.1. Zasady ogólne

Niezależnie od rodzaju materiału od pacjenta pobieranego do badań, aby uzyskane wyniki analizy mikrobiologicznej były rzetelne, należy wdrożyć właściwe postępowanie w zakresie sposobu, czasu czy miejsca jego pozyskiwania (Szewczyk, 2019).

Czas pobrania materiału klinicznego:

- we wczesnych etapach choroby przed rozpoczęciem leczenia przeciwdrobnoustrojowego,
- w przypadku badania kontrolnego w celu oceny efektywności leczenia – co najmniej po 7 dniach od zakończenia terapii przeciwdrobnoustrojowej.



Rycina 1. Uproszczony schemat diagnostyki mikrobiologicznej w kierunku bakterii i grzybów w przypadku podejrzenia infekcji (rys. D. Szmałda-Krygier)

ZLECENIE BADANIA LABORATORYJNEGO			
NAZWISKO: _____ IMIĘ: _____ PŁEĆ: _____ PESEL: DATA URODZENIA: - - kod kreskowy			dane jednostki kierującej/adres zamieszkania pacjenta
ROZPOZNANIE: _____ RODZAJ MATERIAŁU: _____ ANTYBIOTYKOTERAPIA: _____ UWAGI: _____			
BADANIA BAKTERIOLOGICZNE ☐ posiew wymazu z gardła ☐ posiew wymazu z jamy ustnej ☐ posiew wymazu z nosa ☐ posiew wymazu z nosogardzieli ☐ posiew wymazu z oka prawego ☐ posiew wymazu z oka lewego ☐ posiew wymazu z ucha prawego ☐ posiew wymazu z ucha lewego ☐ posiew moczu ☐ posiew wymazu z cewki moczowej ☐ posiew kału ☐ posiew wymazu z kału ☐ posiew wymazu z odbytu ☐ posiew nasienia ☐ posiew wymazu z pochwy ☐ posiew wymazu z szyjki macicy ☐ posiew krwi tlenowo ☐ posiew krwi beztlenowo ☐ posiew płynu mózgowo-rdzeniowego ☐ posiew płwociny ☐ posiew płynu opłucnowego ☐ posiew popłuczyn BAL ☐ posiew wydzieliny oskrzelowej ☐ posiew wymazu z rurki intubacyjnej ☐ posiew wymazu z rurki tracheostomijnej ☐ posiew końcówki wkłucia centralnego ☐ punktāt ☐ posiew z ropy ☐ posiew wymazu z rany ☐ posiew w kierunku bakterii beztlenowych		BADANIA MYKOLOGICZNE ☐ posiew z paznokci dłoni ☐ posiew z paznokci stóp ☐ posiew z naskórka dłoni ☐ posiew z naskórka stóp ☐ posiew krwi w kierunku grzybów ☐ posiew ze skóry owłosionej BADANIA CZYSTOŚCIOWE ☐ kontrola procesu sterylizacji ☐ czystość powierzchni ☐ czystość powietrza	
Data i godzina pobrania materiału do badania: _____ Data i godzina przyjęcia materiału do laboratorium: _____		dane (podpis) osoby pobierającej materiał do badania pieczęć i podpis lekarza zlecającego badanie	

Rycina 2. Przykładowy wzór zlecenia do badania mikrobiologicznego (rys. P. Żelechowska)

Miejsce pobrania i objętość próbki do badań:

- materiał powinien być pobierany przez wyszkolonego i uprawnionego pracownika medycznego z miejsc, w których toczy się proces zapalny, z unikaniem zanieczyszczenia przez drobnoustroje zasiedlające okoliczne tkanki, należy pamiętać o zachowaniu zasad aseptyki,
- objętość pobieranego materiału jest zależna od jego rodzaju – niekiedy wystarczy kilka mililitrów, np. w przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) czy ropy,
- w przypadku gdy materiał do badań pobiera sam pacjent (np. mocz), należy go dokładnie poinstruować o rodzaju pobieranego materiału, jego wymaganej objętości, pojemniku transportowym, w którym należy go umieścić, oraz dalszym postępowaniu z próbką.

W przypadku materiałów pobieranych przez osoby do tego uprawnione (lekarze, personel pielęgniarski, personel położniczy, ratownicy medyczni, diagnostki laboratoryjni, technicy analityki medycznej) istotne jest zachowanie przez nie najwyższych standardów zgodnie z procedurami obowiązującymi w danej placówce medycznej, które obejmują m.in.:

- weryfikację tożsamości pacjenta przed pobraniem materiału,
- zmianę rękawiczek jednorazowych po każdym pacjencie,
- dokładne opisanie/zakodowanie pobranej próbki w celu identyfikacji pacjenta w laboratorium,
- prawidłowe postępowanie z próbką po pobraniu (przechowywanie, transport) (Ciepiela, 2021).

ZAPAMIĘTAJ!

Każdy materiał biologiczny należy traktować jako potencjalnie zakaźny.

1.2.2. Zasady szczegółowe

Mocz

U osoby zdrowej wydany mocz jest fizjologicznie jałowy (nie zawiera drobnoustrojów). W celu potwierdzenia bądź wykluczenia zakażeń układu moczowego (ZUM) należy wykonać posiew mikrobiologiczny moczu, najlepiej wraz z badaniem ogólnym. Warto pamiętać, że mocz pobierany do badań diagnostycznych, w szczególności mikrobiologicznych, wymaga (od pacjenta) dokładnego i higienicznego przygotowania. Istotne jest również umieszczenie materiału w odpowiednim pojemniku, który musi być sterylny (Brunzel, 2016; Bil-Lula i in., 2019). Na rycinie 3 przedstawiono pojemniki i worki wykorzystywane do pobierania i transportowania próbek moczu do badania mikrobiologicznego.

Metody pobierania moczu do badań:

- metoda środkowego strumienia – oddanie moczu musi poprzedzać dokładne umycie narządów moczowo-płciowych za pomocą wody i mydła, bez wycierania lub z wytarciem za pomocą ręcznika jednorazowego. Należy oddać próbkę moczu po spoczynku nocnym z minimum kilkugodzinnym gromadzeniem moczu w pęcherzu. Pierwszą porcję moczu należy odrzucić. Do jałowego, jednorazowego pojemnika pobiera się mocz ze środkowego strumienia (około 20–70 ml), a pozostałą część należy odrzucić. Pojemnik na mocz należy szczelnie zamknąć i przetransportować w temperaturze otoczenia do punktu pobrania / laboratorium w ciągu 2 godzin od pobrania (Ciepiela, 2021);

ZAPAMIĘTAJ!

Jeżeli czas transportu próbki do laboratorium wydłuży się, mocz należy przechowywać w temperaturze 2–8°C.



Rycina 3. Pojemniki przeznaczone do pobierania i transportowania próbek moczu do badania mikrobiologicznego: jałowy pojemnik na mocz (A), podłoże transportowo-wzrostowe (B), jałowy woreczek na mocz dziewczynki (C), jałowy woreczek na mocz chłopca (D). Źródła zdjęć: el-comp.pl (A), biomed.pl (B), zarys.pl (C, D)

- pobranie od pacjenta z założonym cewnikiem urologicznym – wskazane jest, aby osoba pobierająca przygotowała się do tego poprzez dezynfekcję rąk oraz założenie rękawiczek jednorazowych. U pacjentów cewnikowanych próbkę moczu należy pobierać w sposób przerywany/ciągły bezpośrednio po założeniu nowego cewnika. Pierwszą porcję pobranego moczu należy odrzucić, a do pojemnika jednorazowego na mocz pobiera się około 5–10 ml moczu;
- metoda nakłucia nadłonowego – w przypadku tej metody mocz jest pobierany tylko przez lekarza po wcześniejszej dezynfekcji rąk oraz założeniu rękawiczek jednorazowych. Miejsce wkłucia u pacjenta należy zdezynfekować i odczekać, aż preparat wyschnie. Metoda polega na nakłuciu pęcherza moczowego nad spojeniem łonowym, pobraniu moczu w objętości około 5–10 ml i przelaniu go do jednorazowego jałowego pojemnika na mocz, który należy przetransportować do laboratorium;
- pobieranie moczu od niemowląt i małych dzieci – wskazane jest, aby osoba pobierająca przygotowała się do pobrania moczu od dziecka poprzez higieniczną dezynfekcję rąk oraz założenie rękawiczek jednorazowych. Po umyciu okolic cewki moczowej dziecko może oddać mocz bezpośrednio do jałowego i jednorazowego pojemnika na mocz lub do jałowego woreczka przyklejonego do ciała tak, aby otwór pokrywał się z ujściem cewki moczowej. Napęczniony pojemnik lub woreczek po odklejeniu od ciała należy zabezpieczyć i przetransportować do punktu pobrań / laboratorium (Załęska-Ponganis i in., 2016).

ZAPAMIĘTAJ!

Do badań laboratoryjnych nie wolno przysyłać próbki moczu oddanego przez dziecko do nocnika lub pieluszki.

- na podłoże transportowo-wzrostowe – przygotowanie do pobrania: tak jak w przypadku pobrania metodą środkowego strumienia. Odkręcić wieczko z umocowaną płytką z podłożami i ostrożnie wyjąć z pojemnika. Pierwszą partię moczu odrzucić, a następnie, bez przerywania oddawania moczu, wypełnić przygotowany wcześniej pojemnik. W pojemniku wypełnionym moczem należy zanurzyć płytkę (trzymając płytkę za nakrętkę) na kilka sekund. Wyjąć płytkę z pojemnika, odczekać kilka sekund, aż nadmiar moczu ścieknie z płytki. Mocz wylać z pojemnika. Płytkę z podłożami ponownie umieścić w pojemniku, zamknąć pojemnik i dokręcić nakrętkę. Należy zwrócić szczególną uwagę, by nie dotykać płytki, jej brzegów i wnętrza pojemnika. Przed dostarczeniem do laboratorium pojemnik z podłożami przechowuje się w temperaturze pokojowej.

MATERIAŁY Z PRZEWODU POKARMOWEGO

Wskazaniami do wykonania badań mikrobiologicznych (posiewu) kału mogą być: podejrzenie zakażenia bakteryjnego (np. salmonelloza, zakażenie *Helicobacter pylori*) czy wirusowego (np. adenowirusami, rotawirusami) lub zarażenia pasożytniczego przewodu pokarmowego (np. ogoniastkiem jelitowym, owsikiem ludzkim, glistą ludzką). Próbkę skierowaną do laboratorium może być w postaci kału, wymazu z kału lub wymazu z odbytu. Na rycinie 4 przedstawiono pojemnik oraz wymazówkę, wykorzystywane w celu pobierania i transportu tego materiału.

Kał

Kał po oddaniu do czystego i suchego pojemnika należy pobrać szpatułką do jałowego pojemnika na kał (wystarczy wielkość orzecha laskowego). W przypadku kału płynnego należy pobrać próbkę w objętości około 2–5 ml do jałowego pojemnika na kał. Pojemnik z próbką kału należy szczelnie zamknąć i przetransportować w temperaturze pokojowej w ciągu 2–3 godzin do punktu pobrań lub laboratorium (Ciepiela, 2021).



Rycina 4. Pojemniki przeznaczone do pobierania i transportowania próbek kału w celu wykonania badania mikrobiologicznego: jałowy pojemnik na kał (A), jałowa wymazówka z podłożem transportowym (B). Źródła zdjęć: el-comp.pl (A), sklep.biomedico.pl (B)

Wymaz z kału

Gdy istnieje prawdopodobieństwo, że czas dostarczenia próbki kału do laboratorium będzie dłuższy niż 2 godziny, należy wykonać wymaz z kału na podłoże transportowe. W tym celu należy zanurzyć jałową wymazówkę w kilku miejscach oddanego kału i umieścić ją w podłożu transportowym.

Wymaz z odbytu

Jałową wymazówkę należy otworzyć z opakowania w dniu badania. Wymaz jest pobierany poprzez kilkukrotne obrócenie wymazówki (zwilżonej jałową solą fizjologiczną) w odbytnicy, umieszczonej na głębokość około 5 cm. Po pobraniu wymazówkę należy umieścić w podłożu transportowym i przetransportować w temperaturze pokojowej w ciągu 2–3 godzin do punktu pobrań / laboratorium.

KREW

Krew jest materiałem fizjologicznie jałowym. Wskazaniami do wykonania badania mikrobiologicznego krwi jest podejrzenie bakteriemii lub fungemii, gorączki o nieznanym przyczynie oraz sepsy. Materiał ten może być pomocniczy w diagnostyce szpitalnego i pozaszpitalnego zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (ZOMR) i ropni mózgu, zakażeń układu moczowo-płciowego, zakażeń miejsca operowanego, zakażeń w obrębie jamy brzusznej czy powikłań po ropnym zapaleniu ucha środkowego i zatok przynosowych (Literacki i in., 2019).

ZAPAMIĘTAJ!

Bakteriemia i fungemia to zakażenia krwi bakteriami lub grzybami, potwierdzone ich wyizolowaniem, które mogą przebiegać bez towarzyszących objawów klinicznych oraz nie mieć żadnych następstw i powikłań.

Sepsa to ogólnoustrojowa reakcja zapalna o potwierdzonym podłożu infekcyjnym, przebiegająca z określonymi objawami.

Pobieranie krwi na posiew

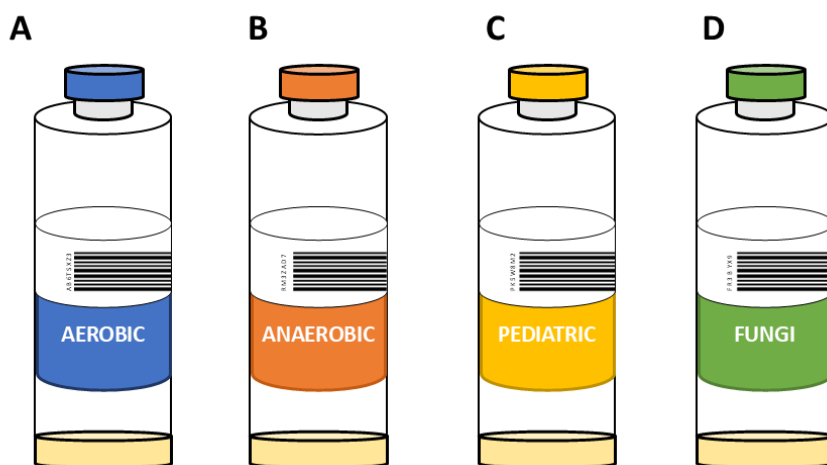
Osoba pobierająca przygotowuje zestaw do pobrania krwi oraz butelki z podłożami hodowlanymi ogrzane do temperatury 37°C (należy się upewnić, że nie są one przeterminowane, uszkodzone lub zanieczyszczone). Po higienicznej dezynfekcji rąk należy zdjąć pokrywki i zdezynfekować gumowe korki butelek (po tym, jak preparat wyschnie). Osoba pobierająca zakłada jednorazowe rękawiczki, wybiera odpowiednie miejsce do wkłucia i je dezynfekuje (po tym, jak preparat wyschnie). Krew pobierana jest za pomocą igły i strzykawki lub zestawu do pobierania z igłą motylkową bezpośrednio do butelek z podłożami hodowlanymi. Na rycinie 5 przedstawiono butelki z podłożami przeznaczonymi do analizy mikrobiologicznej krwi.

ZAPAMIĘTAJ!

Krew może być pobierana jedynie przez osobę do tego uprawnioną!

PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY

Badanie mikrobiologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), czyli jego posiew, jest wykonywane jako pierwszy etap diagnostyki w przypadku podejrzenia zakaźnej etiologii choroby neurologicznej, szczególnie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W warunkach fizjologicznych PMR jest jałowy. W przypadku podejrzenia zakażeń OUN mikrobiologiczne badanie PMR powinno być wykonywane łącznie z posiewem krwi.



Rycina 5. Rodzaje butelek z podłożami hodowlanymi przeznaczonymi do oceny mikrobiologicznej krwi. Od lewej: butelka do hodowli tlenowej (A), butelka do hodowli beztlenowej (B), butelka pediatriczna (C), butelka do hodowli grzybów (D) (rys. P. Żelechowska)

PMR jest pobierany wyłącznie przez lekarza techniką punkcji w okolicy lędźwiowo-krzyżowej z użyciem igły ze strzykawką. Na ogół pobierane są 2–3 próbki materiału (do badań analitycznych, mikrobiologicznych i cytologicznych) w niewielkiej objętości, około 1–2 ml lub 1 ml/5 kg masy ciała. Wkłucie między kręgiem L4 a L5 powinno nastąpić po dezynfekcji skóry pacjenta preparatem na bazie alkoholu. Uzyskany po odwirowaniu osad materiału służy do wykonania posiewów na podłoża hodowlane dla bakterii i grzybów oraz wykonania mikroskopowych preparatów barwionych, a supernatant służy do badań serologicznych (Solnica i in., 2022).

ZAPAMIĘTAJ!

PMR wymaga jak najszybszego dostarczenia do laboratorium mikrobiologicznego i transportu w 37°C w podłożu transportowym.

MATERIAŁY Z DRÓG ODDECHOWYCH I PŁUC

W zależności od obszaru toczącego się zapalenia w obrębie układu oddechowego wartość diagnostyczną będą mieć inne rodzaje materiałów klinicznych (Kutera-Chrobok i in., 2021). W tabeli 1 przedstawiono materiały pobierane od pacjenta w przypadku podejrzenia infekcji tego obszaru.

Tabela 1. Materiały z górnych i dolnych dróg oddechowych oraz płuc mające znaczenie w diagnostyce mikrobiologicznej

GÓRNE DROGI ODDECHOWE	DOLNE DROGI ODDECHOWE I PŁUCA
wymaz z jamy ustnej	plwocina
wymaz z gardła	wydzielina oskrzelowa
wymaz z nosa	bronchoaspirat
wymaz z nosogardzieli	popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe (ang. <i>bronchoalveolar lavage</i> , BAL)
wymaz z krtani	mini BAL
punktat z zatok	płyn z opłucnej
	biopsaty z płuca i opłucnej

Wymaz z jamy ustnej/gardła/nosa/nosogardzieli/krtani

Wskazaniem do pobrania wymazu jest badanie w kierunku zakażeń górnych dróg oddechowych, materiał powinien być pobierany na czczo za pomocą jałowej wymazówki z miejsc zmienionych zapalnie, pokrytych wydzielinami (w przypadku suchych błon śluzowych można zwilżyć wacik wymazówki jałową solą fizjologiczną). W sytuacji braku możliwości szybkiego przekazania pobranego materiału do laboratorium należy pobrać materiał do zestawów zawierających dodatkowo podłoże transportowe.

Punktat z zatok

Punktat to wydzielina otrzymywana poprzez nakłucie zatoki i aspirację treści obecnej w zatoce, pobierana przez lekarza laryngologa. Materiał należy pobrać do odpowiednich podłoży płynnych w kierunku wykrycia drobnoustrojów tlenowych i beztlenowych stosowanych do posiewu krwi lub do jałowego, suchego pojemnika. Materiał należy transportować w temperaturze pokojowej do 2 godzin od pobrania.

Plwocina

To wykrztuśna wydzielina dróg oddechowych (pochodząca z oskrzeli, krtani i nosa), zawierająca śluz, komórki i ewentualne czynniki infekcyjne. Jest poddawana badaniom bakteriologicznym lub grzybiczym (w kierunku m.in. gruźlicy, pneumocystozy) oraz cytologicznym (nowotwory). Wskazania do wykonywania badania tego materiału to przewlekłe infekcje dolnych dróg oddechowych i płuc, ale także wykrycie nowotworu płuc. Materiał należy przechowywać i transportować w 4°C (nie dłużej niż 24 godziny od momentu pobrania).

Wydzielina oskrzelowa

Odsysana u pacjentów zaintubowanych po wprowadzeniu cewnika do odsysania przez rurkę intubacyjną. Po pobraniu materiał należy przenieść do jałowego pojemnika i przetransportować do laboratorium w ciągu 3 godzin.

Bronchoaspirat

Wydzielinę pobiera się po wprowadzeniu bronchofiberoskopu za pomocą szczoteczki, specjalnie osłoniętej przed zanieczyszczeniami, do podłoża transportowego / jałowego pojemnika z solą fizjologiczną. Po pobraniu materiał należy umieścić w jałowym pojemniku i przetransportować do laboratorium w ciągu 3 godzin.

Popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe

To materiał pobierany przez lekarza z płuc w trakcie płukania oskrzelowo-płucnego podczas bronchoskopii. Płukanie polega na podaniu do oskrzeli pewnej ilości fizjologicznego roztworu NaCl lub jałowego płynu Ringera i odessaniu go.

Płyn z jamy opłucnej

Materiał jest pobierany za pomocą punkcji przez lekarza pod kontrolą USG do podłoży transportowo-wzrostowych (butelek do posiewu krwi).

Biopsjaty z płuca i opłucnej

W przypadku ropni pobierane są do jałowego pojemnika z małą ilością jałowej soli fizjologicznej.

MATERIAŁY Z DRÓG MOCZOWO-PŁCIOWYCH

Materiały z dróg moczowo-płciowych mają znaczenie w:

- diagnostyce zakażeń wenerycznych (np. rzeżączki, chlamydiozy),
- diagnostyce waginozy,
- diagnostyce ZUM,
- profilaktyce zakażeń okołoporodowych paciorkowcami grupy B.

Rodzaje pobieranych materiałów:

- u kobiet: wymaz ze ścian lub tylnego sklepienia pochwy / wymaz ze ścian szyjki macicy / wymaz z cewki moczowej,
- u mężczyzn: wydzielina / wymaz / nabłonek z cewki moczowej, nasienie.

1.3. Obserwacja mikroskopowa

Mała zdolność załamывania promieni świetlnych przez bakterie sprawia, że są one niewidoczne w zwykłym mikroskopie świetlnym. Ich wizualizacja jest możliwa po zastosowaniu barwników, które adsorbują się na powierzchni komórek lub rozpuszczają w ich strukturach i tworzą trwałe, barwne kompleksy. Pod względem chemicznym barwniki dzielimy na kwaśne (fuksyna kwaśna, nigrozyna) oraz zasadowe (błękit metylenowy, fiolet krystaliczny, fuksyna zasadowa). Ponieważ powierzchnie komórek, a także ich kwasy nukleinowe, są naładowane ujemnie, w bakteriologii najczęściej stosuje się barwniki zasadowe w roztworach alkoholowych lub wodnych. Barwniki kwaśne są często używane do wybarwienia tła preparatu. Barwienia są stosowane nie tylko w celu uwidocznienia komórek, ale również w celach diagnostycznych, m.in. do wstępnej identyfikacji czynnika zakaźnego (Szewczyk, 2019).

ZAPAMIĘTAJ!

Do przygotowywania preparatów mikroskopowych służą szkiełka przedmiotowe i nakrywkowe. Szkiełka Lindnera z wgłębieniem przeznaczone są do obserwacji preparatów przyżyciowych w wiążącej kropli.

Mikroskop świetlny to urządzenie optyczne, które służy do obserwacji bardzo małych obiektów (komórek, tkanek zwierzęcych i roślinnych), określania morfologii i struktury wewnętrznej komórek czy obserwacji procesów fizjologicznych (zdolność ruchu, sposób rozmnażania). Mikroskop świetlny składa się z dwóch układów – mechanicznego i optycznego. Do elementów układu mechanicznego należą: nasadka dwuoczną, rewolwer obiektywowy, stolik przedmiotowy, śruba makrometryczna, śruba mikrometryczna, podstawa i korpus tworzące statyw, przesuw kondensora oraz przesuw preparatu w płaszczyźnie X/Y (mechanizmy ruchu). Na układ optyczny mikroskopu składają się elementy powiększające (okulary i obiektyw) oraz oświetlające (kondensor, źródło światła).

Jedną z wielkości charakteryzujących mikroskop jest zdolność rozdzielcza określana jako najmniejsza odległość między dwoma punktami, które na uzyskanym obrazie mogą być jeszcze traktowane jako odrębne. Powiększenie całkowite (P_c) mikroskopu równe jest iloczynowi powiększenia okularu (P_{ok}) i obiektywu (P_{ob}).

Poprawność mikroskopowania jest uzależniona od kilku zasad, które należy wdrożyć:

- wyczyścić elementy optyczne miękką, suchą szmatką,
- umieścić preparat mikroskopowy na stoliku przedmiotowym,
- uchwycić obraz śrubą makrometryczną,
- wyregulować ostrość widzenia śrubą mikrometryczną.

W przypadku wykonywania rysunku danego obiektu:

- obserwacje mikroskopowe należy prowadzić w kilku polach widzenia, wybierając obraz o typowych kształtach i proporcjach komórek,
- rysunek należy wykonać ołówkiem o średniej twardości,
- na rysunku nie należy zaznaczać pola widzenia,
- linia rysunku musi być ciągłą, a rysunek prosty, konturowy, pozbawiony ozdób i cieniowania,
- rysunek powinien być wyraźny, zachowujący proporcje i oddający rzeczywistą wielkość obserwowanych obiektów,
- na rysunek składają się: obiekt, opis obiektu, wielkość powiększenia (np. 400×, 1000×), metoda barwienia oraz podpis wyjaśniający pochodzenie obiektu,
- rysunek powinien zawierać wzorzec wielkości (skalę), tak aby określić rzeczywiste wymiary struktur obserwowanych pod mikroskopem.

ZAPAMIĘTAJ!

Obserwacja mikroskopowa pozwala na wstępną identyfikację bakterii w materiale klinicznym.

2. Morfologia i fizjologia bakterii

W tym rozdziale omówiono morfologię bakterii – struktury, które można zidentyfikować w ich obrębie oraz sposoby wizualizacji bakterii za pomocą odpowiednich metod barwienia. Poniżej przedstawiono podstawowe kształty i ugrupowania tworzone przez bakterie wraz z przykładami.

Bakterie to jednokomórkowe organizmy prokariotyczne, tworzące odrębną domenę. Średnia wielkość komórek bakteryjnych waha się między 1 a 10 μm (Schulz i Jørgensen, 2001). W odróżnieniu od komórek eukariotycznych (roślin, grzybów czy zwierząt) organizmy te charakteryzują się mniej skomplikowaną budową (Woese i Fox, 1977). Podstawową cechą różnicującą jest brak jądra komórkowego – materiał genetyczny prokariotów (DNA, kwas deoksyrybonukleinowy) jest zlokalizowany bezpośrednio w cytoplazmie. Dodatkowo komórki prokariotyczne nie posiadają błoniastych struktur komórkowych, tj. mitochondriów, aparatu Golgiego czy retikulum endoplazmatycznego.

2.1. Klasyfikacja i nazewnictwo bakterii

Pojęcie „klasyfikacja” w kontekście biologicznym odnosi się do uporządkowania jednostek w grupy wyższego rzędu. Klasyfikacja mikroorganizmów zaliczanych do prokariotów opisuje każdy gatunek oraz grupuje je głównie według pokrewieństwa. Innymi najczęściej stosowanymi kryteriami w klasyfikacji bakterii są morfologia (kształt, budowa ściany komórkowej, obecność przetrwalników), fizjologia (zdolność do przyswajania określonych substancji, zapotrzebowanie na tlen) oraz inne kryteria, np. wywoływane choroby (Ferraz Helene i in., 2022).

Formalną jednostką klasyfikacji organizmów jest takson, który może obejmować jedynie formy pochodzące od jednego gatunku macierzystego. Taksony szereguje się w porządku hierarchicznym. W mikrobiologii podstawową jednostką jest szczep (jako najmniejsza grupa klasyfikacyjna bakterii), czyli zbiór komórek o identycznych cechach. Dla każdego gatunku istnieje szczep wzorcowy (lub szczepy, gdy jest ich kilka) – zazwyczaj najczęstszy lub najwcześniej wyizolowany, którego cechy fenotypowe i budowa genomu zostały przyjęte za najbardziej reprezentatywne. Szczepy wzorcowe są przechowywane w kolekcjach mikroorganizmów, np. ATCC (ang. American Type Culture Collection), i są często wykorzystywane do walidacji metod badawczych. Klinicznie szczep odnosi się do izolatu lub grupy izolatów, które można odróżnić od innych izolatów tego samego gatunku drobnoustroju. Szczepy bakteryjne grupowane są następnie w gatunki, a gatunki – w rodzaje. Rodzaje mogą być również porządkowane w rodziny.

Podobnie jak w systematyce zwierząt i roślin, w systematyce bakterii obowiązuje binominalne nazewnictwo gatunków, czyli zasada naukowego oznaczania nazw danego gatunku organizmów biologicznych z wykorzystaniem dwóch członów. Pierwszy z nich to nazwa rodzajowa (zapisywana zawsze wielką literą), drugi natomiast to nazwa gatunkowa (zapisywana małą literą). Klasyfikacja i nazewnictwo bakterii są regulowane przez wytyczne Międzynarodowego Komitetu Systematyki Prokariotów (ang. International Committee on Systematics of Prokaryotes; ICSP).

ZAPAMIĘTAJ!

W tekście drukowanym nazwy łacińskie wszystkich taksonów (typ, klasa, rząd, rodzina, rodzaj, gatunek) powinny być zapisane kursywą:

<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	299v
rodzaj	gatunek	szczep

Niejednokrotnie w zapisie nazw bakterii stosuje się skróconą formę nazewnictwa – polega ona na zapisaniu pierwszej litery nazwy rodzajowej bakterii, po której stawia się kropkę, a nazwa gatunkowa pozostaje zapisana w formie pełnej (np.: skrócona nazwa *Lactobacillus plantarum* to *L. plantarum*).

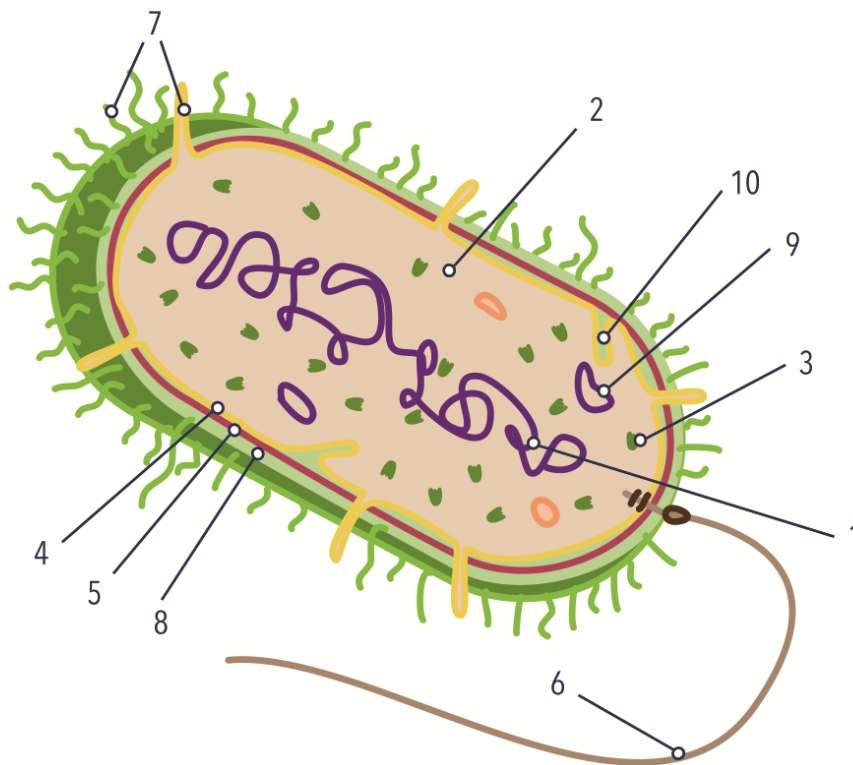
W nazewnictwie organizmów posługujemy się następującymi oznaczeniami:

- **sp.** – które pochodzi od łacińskiego *species*, czyli gatunek, stawiany jest po nazwie rodzaju i wskazuje na pojedynczy nieokreślony gatunek z danego rodzaju, np. ***Lactobacillus sp.*** wskazuje na nieokreślony gatunek z rodzaju *Lactobacillus*,
- **spp.** (łac. *subspecies*) to forma mnoga od **sp.**, którą stosujemy po nazwie rodzajowej, gdy mamy na myśli większą liczbę nieokreślonych gatunków w ramach danego rodzaju.

Najnowsze dane dotyczące systematyki bakterii udostępniane są na łamach „International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” oraz „Bergey's Manual Trust”. Z kolei aktualna taksonomia bakterii jest przedstawiana w wielu bazach danych – jedną z nich jest Genome Taxonomy Database opisująca znormalizowaną taksonomię drobnoustrojów w oparciu o filogenezę ich genomu.

2.2. Budowa strukturalna komórki bakteryjnej

Komórka bakteryjna jest zbudowana z elementów stałych oraz elementów niestałych (występujących tylko w budowie niektórych bakterii). Na rycinie 6 zwizualizowano najważniejsze struktury bakterii.



Rycina 6. Ogólna budowa komórki bakteryjnej: 1 – nukleoid, 2 – cytoplazma, 3 – rybosom, 4 – błona cytoplazmatyczna, 5 – ściana komórkowa, 6 – rzęska, 7 – fimbrie, 8 – otoczką, 9 – plazmid, 10 – mezosom (rys. D. Szmajda-Krygier)

Do elementów stałych zaliczają się:

- nukleoid – chromosom bakteryjny występujący w postaci DNA; jest podstawową strukturą przechowującą informację genetyczną bakterii;
- cytoplazma – substancja wypełniająca wnętrze komórki, zbudowana w 80% z wody – resztę stanowią rozpuszczone w niej białka, węglowodany, lipidy i inne związki organiczne i nieorganiczne o budowie niskocząsteczkowej; tworzy środowisko wewnętrzne komórki, w którym zachodzą liczne reakcje biochemiczne;
- rybosomy – zawieszone w cytoplazmie organelle o stałej sedymentacji Svedberga (S) 70S, zbudowane z dwóch podjednostek 30S i 50S, odpowiedzialne za syntezę białek (Shajani i in., 2011);
- błona cytoplazmatyczna – zbudowana z dwóch warstw fosfolipidów oraz związanych z nimi białek; umiejscowiona pomiędzy ścianą komórkową a cytoplazmą; pełni wiele funkcji, m.in. bierze udział w procesach energetycznych oraz zapewnia wymianę substancji odżywczych i metabolitów między komórką a środowiskiem zewnętrznym;
- ściana komórkowa – występuje u większości bakterii (wyjątek stanowią bakterie z rodzaju *Mycoplasma* i *Ureaplasma*) na zewnątrz od błony cytoplazmatycznej, stanowi warstwę ochronną; nadaje kształt komórce, pełni ważną rolę w prawidłowym podziale komórkowym; podstawowym składnikiem budującym ścianę komórkową bakterii jest peptydoglikan (inaczej mureina) – polimer składający się z łańcuchów N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym (wyjątkiem są bakterie z rodzaju *Chlamydia*, które nie posiadają w ścianie komórkowej peptydoglikanu) (Miyata i Ogaki, 2006; Klöckner i in., 2018).

Do elementów niestałych (fakultatywnych) zaliczają się:

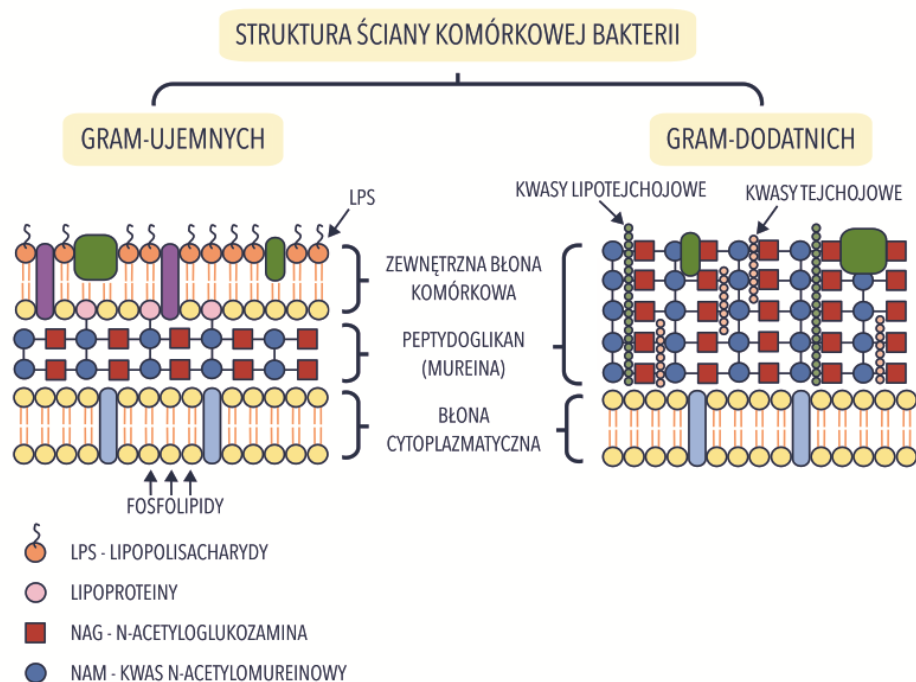
- rzęski – zlokalizowane na zewnątrz komórki, a zbudowane z białka – flageliny; są odpowiedzialne za ruch bakterii (Nakamura i Minamino, 2019);
- fimbrie – zbudowane z niekurczliwego białka (piliny); wstępują na powierzchni komórek i są krótsze niż rzęski; występują głównie u bakterii Gram-ujemnych, rzadziej u bakterii Gram-dodatnich; wyróżnia się dwa typy fimbrii – fimbrie zwykłe umożliwiające adhezję komórek bakteryjnych do komórek gospodarza oraz fimbrie płciowe uczestniczące w procesie koniugacji (przenoszenia materiału genetycznego z komórki dawcy do biorcy) (Proft i Baker, 2009);
- otoczki – otaczają od zewnątrz ścianę komórkową niektórych bakterii; występują pod postacią warstwy żelu lub śluzu; chronią komórki bakteryjne przed wysychaniem i działaniem mechanizmów odporności wrodzonej organizmu, w którym się namnażają (fagocytoza); biorą udział w adhezji komórek bakterii do komórek gospodarza oraz wpływają na wchłanianie różnych substancji do komórki bakteryjnej (np. na utrudnienie wchłaniania antybiotyków do komórki bakterii) (Hazlett, 2005);
- plazmidy – czyli cząsteczki pozachromosomowego DNA; występują w cytoplazmie komórki; zawierają geny, które nie warunkują funkcjonowania bakterii, jednak mogą kodować dodatkowe elementy, np. oporność na antybiotyki (Helinski, 2022; Smillie i in., 2010);
- mezosomy – artefakty komórek prokariotycznych, będące uwypukleniami błony cytoplazmatycznej; stanowią miejsce zakotwiczenia nukleoidu; biorą udział w syntezie ściany komórkowej; występują tylko u niektórych bakterii;
- przetrwalniki (endospory) – formy bakterii, które umożliwiają przetrwanie w niekorzystnych warunkach; do bakterii przetrwalnikowych zalicza się *Bacillus* spp. i *Clostridium* spp. (Cutting i Ricca, 2014).

2.2.1. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych

Ze względu na różnice w budowie ścian komórkowych bakterii podzielono je na Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Klasyfikacja ta stanowi podstawę barwienia Grama, jednej z fundamentalnych metod diagnostycznych w mikrobiologii. Szczegóły tej techniki zostaną omówione w dalszej części publikacji. Trzecią grupę stanowią bakterie kwasooporne, których ściana komórkowa ma odmienną strukturę i wymaga zastosowania innych technik barwienia, takich jak metoda Ziehla–Neelsena.

Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich charakteryzuje się prostą strukturą. Składa się z wielu warstw peptydoglikanu (od 30 do 40), a jej grubość całkowita waha się od 30 nm do 100 nm. Do peptydoglikanu są przyłączone wiązaniami kowalencyjnymi kwasy tejchojowe. Ponadto z glikolipidami błony cytoplazmatycznej są połączone kwasy lipotejchojowe. Kwasy te pełnią wiele różnorodnych funkcji – odpowiadają m.in. za utrzymanie właściwości fizykochemicznych powierzchni komórki oraz oporność/wrażliwość na peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Dodatkowo w skład ściany komórkowej tych bakterii wchodzi także różne polisacharydy, tj. mannoza czy glukoza, oraz białka, m.in. białko A (charakterystyczne dla *Staphylococcus aureus*) czy białko M (występujące w ścianie komórkowej *Streptococcus pyogenes*) (Metzgar i Zampolli, 2011; Rigi i in., 2019).

Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych jest nieco bardziej złożona (Brown i in., 2015). Jej grubość waha się w granicach 10–15 nm. Bezpośrednio przy błonie cytoplazmatycznej znajduje się przestrzeń periplazmatyczna zawierająca liczne białka. Ponad nią jest zlokalizowany peptydoglikan (zwykle 1–3 warstwy). Istnieje jednak pewien wyjątek – w ścianie komórkowej bakterii z rodzaju *Chlamydia* peptydoglikan nie występuje. Nad warstwą peptydoglikanu znajduje się błona zewnętrzna ściany komórkowej, odpowiedzialna za oporność bakterii Gram-ujemnych na czynniki zewnętrzne, np. antybiotyki (utrudnianie dostępu czynników zewnętrznych do struktur leżących poniżej). Błona zewnętrzna składa się z dwóch warstw lipidów – wewnętrznej zbudowanej z fosfolipidów oraz zewnętrznej tworzonej przez cząsteczki lipopolisacharydu (LPS) oraz białek (enzymów, białek związanych z aktywnym transportem oraz poryn). LPS jest charakterystyczną dla bakterii Gram-ujemnych endotoksyną wykazującą silne działanie immunogenne i prozapalne. Składa się z polisacharydu O-swoistego, oligosacharydowego rdzenia oraz lipidu A. Polisacharyd O-swoisty stanowi najbardziej zewnętrzną część LPS i pełni rolę antygeny powierzchniowego rozpoznawanego przez układ odpornościowy gospodarza. Elementem łączącym polisacharyd O-swoisty z lipidem A jest rdzeń oligosacharydowy. Lipid A stanowi najbardziej wewnętrzną część LPS i odpowiada za toksyczność bakterii Gram-ujemnych. Na rycinie 7 przedstawiono schematyczną budowę ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.



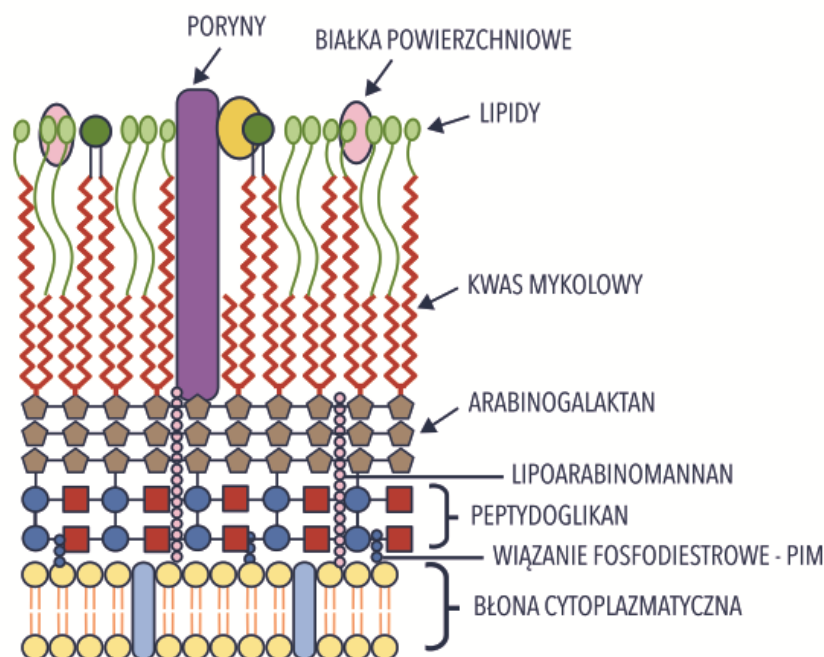
Rycina 7. Porównanie budowy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (rys. D. Szmajda-Krygier)

2.2.2. Budowa ściany komórkowej bakterii kwasoopornych

Ściana komórkowa bakterii kwasoopornych, czyli bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, zawiera duże ilości lipidów (60% suchej masy) (Wang i in., 2023). Jest zbudowana z pojedynczej warstwy peptydoglikanu połączonej z arabinogalaktanem, który łączy się z wysokocząsteczkowymi kwasami mykologowymi (ryc. 8). Taka budowa zapewnia małą przepuszczalność ściany komórkowej, co powoduje zmniejszenie możliwości przenikania np. antybiotyków do komórki.

2.3. Metody wizualizacji komórek bakterii i ich struktur

Klasyczne metody barwienia można podzielić na pozytywne, w których wybarwia się bakterie i są one widoczne na bezbarwnym tle, negatywne, w których wybarwia się tło, a bakterie pozostają niewybarwione, oraz pozytywno-negatywne, w których po wybarwieniu komórek i struktur bakterierynych wybarwia się też tło (albo na odwrót). Inny podział metod barwienia opiera się na liczbie zastosowanych barwników. Wyróżnia się zatem barwienie proste, z zastosowaniem tylko jednego barwnika, oraz złożone, w których stosuje się kilka barwników według ściśle określonej kolejności. Często stosuje się też tzw. bejce (ułatwiają barwienie albo wzmacniają działanie barwników, np. płyn Lugola) i odbarwiacze (pozwalają na uwidocznienie pewnych bakterii lub ich struktur dzięki odbarwieniu innych bakterii lub struktur, np. alkohol etylowy). Procedury barwienia opisane poniżej mogą różnić się nieznacznie, co wynika z zaleceń producentów odczynników.



Rycina 8. Budowa ściany komórkowej bakterii kwasoodpornych (D. Szmaida-Krygier).

2.3.1. Barwienie Grama

Metoda barwienia Grama, opracowana przez Hansa Christiana Grama w 1884 roku, jest niezwykle istotnym narzędziem w diagnostyce mikrobiologicznej, umożliwiającym różnicowanie bakterii na dwie główne kategorie: bakterie Gram-dodatnie (zabarwienie fioletowe) oraz bakterie Gram-ujemne (zabarwienie różowe). Na kolor zabarwienia komórek bakteryjnych mają wpływ zróżnicowany skład i struktura ich ściany komórkowej (Moyes i in., 2009). Procedura barwienia Grama obejmuje kilka etapów. Pierwszym krokiem jest zastosowanie fioletu krystalicznego, który jest barwnikiem podstawowym, nadającym bakteriom pierwotną barwę fioletową. Następnym krokiem barwienia jest zastosowanie płynu Lugola, który stosuje się w celu wzmocnienia i stabilizacji działania fioletu krystalicznego. Po tym etapie następuje odbarwienie preparatu za pomocą alkoholu – bakterie Gram-dodatnie zachowują swoją barwę (posiadają grubszą warstwę peptydoglikanu budującego ścianę komórkową, co sprawia, że zatrzymują barwniki, nawet po odbarwieniu), podczas gdy Gram-ujemne tracą barwę (mają cienką warstwę peptydoglikanu, co powoduje, że tracą barwę po zastosowaniu alkoholu) i stają się niewidoczne w preparacie mikroskopowym. Ostatnim krokiem jest dobarwienie preparatu za pomocą safraniny, która jest barwnikiem kontrastowym. Ten etap pozwala na ostateczną identyfikację bakterii – bakterie Gram-dodatnie bakterie pozostają fioletowe, a Gram-ujemne przyjmują barwę różową (Beveridge, 2001; Prajapati i in., 2018; Vijayakumar i in., 2023).

2.3.2. Barwienie Burri–Ginsa

Barwienie to ma na celu uwidocznienie bezbarwnej otoczki bakteryjnej pokrywającej na zewnątrz zabarwioną komórkę wegetatywną na tle barwnego tła preparatu. Otoczka może być łatwo usunięta z powierzchni komórki w wyniku podgrzewania. Dlatego też w tym barwieniu nie stosuje się termicznego utrwalania preparatu. Zawiesinę komórek miesza się z gruboziarnistym barwnikiem, np. nigrozyną, i pozostawia do wyschnięcia w powietrzu atmosferycznym. Na tym etapie zabarwione zostaje jedynie tło preparatu. Następnie komórki bakteryjne dobarwia się fuksyną fenolową. W wyniku barwienia na ciemnym polu preparatu widoczne są niezabarwione otoczki okalające zabarwione na różowo komórki (Breakwell i in., 2009).

2.3.3. Barwienie Writza (*Schaeffera–Fultona*)

Endospory nie barwią się w czasie zwykłego barwienia komórki barwnikami zasadowymi, można je natomiast wybarwić zielenią malachitową na gorąco. Stosowaną metodą barwienia endospor jest metoda Writza, zwana też barwieniem Schaeffera–Fultona (Hamouda i in., 2002). Jest przykładem barwienia pozytywnego złożonego, pozwala na zabarwienie przetrwalników wewnątrz komórki bakterii. Polega na naniesieniu na utrwalony preparat mikrobiologiczny wodnego roztworu zieleni malachitowej, a następnie na kilkukrotnym podgrzaniu szkiełka podstawowego w płomieniu palnika do zagotowania barwnika. Zieleń malachitowa w podwyższonej temperaturze penetruje powłoki przetrwalnika i zabarwia go, podobnie jak komórkę vegetatywną. Kolejnym etapem jest przemywanie preparatu wodą – następuje dekoloryzacja. Barwnik silnie zaadsorbowany we wnętrzu przetrwalnika nie zostaje z niego wypłukany w przeciwieństwie do komórki bakterii, która się odbarwia. Bezbarwną komórkę vegetatywną dobarwia się zasadowym barwnikiem kontrastowym – safraniną. W wyniku barwienia przetrwalniki są zielone, a komórki vegetatywne – różowe.

2.3.4. Barwienie Doernera

Innym sposobem wybarwienia przetrwalników jest zastosowanie metody Doernera. Pozwala ona na obserwację zabarwionych przetrwalników wewnątrz bezbarwnej komórki bakteryjnej na kontrastującym, ciemnym tle preparatu. Do probówki zawierającej zawiesinę mikroorganizmów dodaje się fuksynę karbolową i całość umieszcza w gorącej łaźni wodnej. W podwyższonej temperaturze fuksyna penetruje warstwy przetrwalnika i barwi go na różowo. Następnie kroplę zawiesiny umieszcza się na szkiełku podstawowym i miesza z barwnikiem negatywnym – nigrozyną, wykonując rozsmar. Preparat wysycha w powietrzu atmosferycznym.

2.3.5. Barwienie Neissera

Barwienie to służy do wykrywania maczugowców polifosforanów (wolutynowych) w komórkach występujących w postaci ziarnistości (zwykle na końcach komórek). Wykazano, że ziarnistości te w silniejszym stopniu wiążą barwnik Neissera (mieszanina fioletu krystalicznego i błękitu metylenowego w alkoholowo-wodnym roztworze) niż cytoplazma. Dobarwianie komórki roztworem chryzoidyny powoduje, że staje się ona żółta („wypiera” barwnik główny z cytoplazmy, ale nie z ziarnistości). Ziarna wolutyny barwią się na kolor granatowo-fioletowy.

2.3.6. Barwienie Ziehla–Neelsena

Barwienie tą metodą umożliwia wykrycie bakterii kwasoodpornych (Reynolds i in., 2009). Ich ściana komórkowa zawiera duże ilości lipidów, wśród których występują kwasy mykolowe warunkujące kwasooporność, przez co bakteria ma zdolność wiązania fuksyny karbolowej (roztwór fuksyny zasadowej z dodatkiem fenolu) i zatrzymania jej w komórce. Ten etap barwienia przeprowadza się na gorąco. Barwnik nie jest wypłukiwany z komórek po zastosowaniu odbarwiacza w postaci alkoholu zakwaszonego kwasem solnym (stąd nazwa kwasooporne). Zastosowanie kontrastowego barwnika (błękitu metylenowego) pozwala odróżnić różowo zabarwione bakterie kwasooporne od innych elementów preparatu zabarwionych na niebiesko.

2.3.7. Barwienie Loefflera

Barwienie to służy do wizualizacji rzęsek bakterii, których liczba i rozmieszczenie stanowią wartość diagnostyczną (Misra i in., 1994). Płynną hodowlę należy inkubować przez 30 min w 37°C, a następnie przenieść 1–3 krople na dokładnie odtłuszczone szkiełko podstawowe i wysuszyć w temperaturze pokojowej. Ponieważ rzęski są bardzo cienkie, istotne jest zwiększenie ich grubości w celu późniejszego wybarwienia i obserwacji mikroskopowej. Na wysuszony preparat nanosi się odczynnik Loefflera (błękit metylenowy) i ogrzewa do ukazania się pary. Preparat po spłukaniu wodą należy dobarwić fuksyną Ziehla i ponownie podgrzać do uzyskania pary. W efekcie rzęski zabarwią się na kolor czerwony.

2.4. Morfologia bakterii

Bakterie wykazują zróżnicowane, charakterystyczne dla danego rodzaju kształty. Najczęściej przyjmują formy kuliste – ziarniaki/ziarenkowce, walcowate – pałeczki i laseczki, skręcone (spiralne) – przecinkowce, śrubowce i krętki (Cabeen i Jacobs-Wagner, 2005; Koufakis i in., 2015). Wyróżnia się także bakterie przyjmujące inne kształty, np. maczugowce.

2.4.1. Formy kuliste

Przedstawicielami form kulistych są ziarniaki, które mogą występować pojedynczo (ziarniak), w parach (dwoinka), w formie łańcuchów (paciorkowce) lub w większych grupach (tetrydy, gronkowce, pakietowce).

DWOINKI

Przedstawicielami dwoinek są bakterie m.in. z rodzajów *Enterococcus* i *Neisseria* czy gatunek *Streptococcus pneumoniae*.

Enterokoki to bakterie występujące w jelitach ludzi oraz zwierząt i są zaliczane do typowych bakterii oportunistycznych. Przykładem drobnoustroju z tego rodzaju jest *Enterococcus faecalis*, czyli paciorkowiec kałowy, który przyjmuje formę dwoinki i często tworzy rozbudowane łańcuchy przypominające koraliki (paciorki). Wiele dwoinek to gatunki lub szczepy wykazujące cechy chorobotwórcze. Przykładami bezwzględnie patogennych dla człowieka dwoinek Gram-ujemnych są *Neisseria gonorrhoeae* (gonokok; patogen błon śluzowych, szczególnie dróg moczowo-płciowych; czynnik etiologiczny rzeżączki) oraz *Neisseria meningitidis* (meningokok; charakteryzuje się obecnością otoczki polisacharydowej, która chroni bakterię przed fagocytozą; czynnik etiologiczny m.in. ciężkiego ZOMR, sepsy meningokokowej o bardzo ciężkim przebiegu oraz łagodnej postaci zapalenia płuc). Hodowla tych drobnoustrojów jest niezwykle trudna – wymagają one do wzrostu podłoża wzbogaconych (Meyer i Buder, 2020). Z kolei przykładem Gram-dodatniej, patogennej dwoinki jest *S. pneumoniae* (pneumokok), który zasiedla nosogardziel zaraz po narodzinach dziecka – odsetek nosicieli na błonach śluzowych górnych dróg oddechowych wśród zdrowych dzieci do 2. roku życia wynosi 30–62%, a ogółem szacuje się, że 90% dzieci i 15% osób dorosłych jest okresowo nosicielami tego drobnoustroju. Czynnik ten charakteryzuje się obecnością otoczki polisacharydowej, która chroni bakterię przed fagocytozą i jest najważniejszą determinantą wirulencji tego patogenu (Carruthers i in., 2007). Pneumokoki są odpowiedzialne za wywoływanie wielu zakażeń u człowieka, np. zapalenia płuc, ZOMR, zapalenia zatok czy zapalenia ucha środkowego.

PACIORKOWCE

Paciorkowce to okrągłe lub owalne Gram-dodatnie bakterie przyjmujące formę skręconych łańcuszków. Do paciorkowców zaliczane są przede wszystkim bakterie z rodzaju *Streptococcus*, ale również niektóre inne bakterie o podobnej morfologii, np. wskazany w poprzednim podrozdziale *Enterococcus faecalis* (dawniej klasyfikowany jako *Streptococcus faecalis*). Bardzo często stanowią one fizjologiczną mikrobiotę śluzówek człowieka. Paciorkowce są klasyfikowane głównie na podstawie ich zdolności do wywoływania hemolizy. Wyróżnia się paciorkowce α – hemolizujące (tzw. zieleniejące, które wywołują częściową hemolizę, np. *S. pneumoniae*, pneumokok, dwoinka zapalenia płuc, czy *S. viridans*), β – hemolizujące (całkowicie hemolizujące – *S. pyogenes*, *S. agalactiae*) oraz γ – hemolizujące (niehemolizujące – *S. salivarius*) (Tille, 2017). Jak wspomniano wyżej, *S. pneumoniae* to bakterie układające się zazwyczaj w pary (dwoinki), niemniej kolonie mogą przyjmować obraz łańcuszków (paciorkowce) różnej długości. W dalszej części przedstawiono gatunki paciorkowców o szczególnym znaczeniu klinicznym, zarówno jako składniki mikrobioty, jak i potencjalne czynniki chorobotwórcze.

- ***S. viridans*** to bakterie odpowiedzialne głównie za powstawanie próchnicy zębów. Jeśli dojdzie do ich translokacji do krwioobiegu (np. w wyniku ekstrakcji zęba lub w przypadku stanu zapalnego dziąseł), mogą prowadzić do rozwoju infekcyjnego zapalenia wsierdza (stan szczególnie niebezpieczny u osób z uszkodzonymi lub sztucznymi zastawkami serca) (Slouha i in., 2023).

- ***S. pyogenes*** jest przykładem paciorkowca, który podobnie jak *S. pneumoniae* wchodzi w skład fizjologicznej mikrobioty nosogardzieli, jednak w sprzyjających warunkach może być przyczyną rozwoju endogennego zakażenia. Najważniejszymi czynnikami wirulencji *S. pyogenes* są m.in. streptolizyna O i S (prowadzące do rozpadu erytrocytów) czy białka M i e (odpowiedzialne za zjawisko mimikry molekularnej, czyli podobieństwa strukturalnego, serologicznego i funkcjonalnego pomiędzy antygenami *S. pyogenes* a tkankami organizmu ludzkiego). Do chorób o etiologii *S. pyogenes* zalicza się ostre, inwazyjne zakażenia (np. anginę, ropowicę, różę, szkarlatynę) oraz powikłania po przebytej infekcji paciorkowcowej (np. zapalenie kłębuszków nerkowych, gorączkę reumatyczną) (Brouwer in., 2023).
- ***S. agalactiae*** występuje w naturalnej mikrobiocie przewodu pokarmowego oraz układu moczowego osób dorosłych. Bakteria ta występuje także w drogach rodnych kobiet (jest to uwarunkowane bliskim sąsiedztwem cewki moczowej). Może to skutkować niebezpiecznymi konsekwencjami podczas porodu – zakażeniem okołoporodowym, co jest jedną z głównych przyczyn wywołujących bakteriemie (bakteryjne zakażenie krwi) u noworodków. U osób dorosłych drobnoustroj ten może wywoływać zakażenie wyłącznie przy osłabionej odporności (zakażenie oportunistyczne) oraz u kobiet podczas porodu (Coggins i Puopolo, 2024).
- ***S. salivarius*** stanowi fizjologiczną mikrobiotę jamy ustnej oraz przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Drobnoustroj ten może pełnić funkcję probiotyczną – wydziela do środowiska substancje, które hamują tworzenie biofilmów przez bakterie patogenne lub zapobiegają temu. Biofilm to rozbudowana struktura składająca się z mikroorganizmów oraz polisacharydowej macierzy, zakotwiczona do danej powierzchni, np. nabłonka jelitowego. W sytuacji translokacji do krwi może odpowiadać za infekcyjne zapalenie wsierdza, szczególnie u pacjentów ze sztucznymi zastawkami.

GRONKOWCE

Gronkowce to bakterie zaliczane do grupy bakterii Gram-dodatnich. Przedstawicielami gronkowców są bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Gronkowce bardzo często wchodzi w skład fizjologicznej mikrobioty błon śluzowych (głównie dróg oddechowych i przewodu pokarmowego) oraz skóry człowieka. Z reguły ten typ kolonizacji jest bezobjawowy. Ze względu na zdolność wytwarzania koagulazy (enzymu białkowego) gronkowce dzieli się na koagulazo-dodatnie (wytwarzające koagulazę) oraz koagulazo-ujemne (niewytwarzające koagulazę) (Szewczyk, 2019).

Najlepiej poznanym gatunkiem wśród gronkowców koagulazo-dodatnich jest gronkowiec złocisty – *S. aureus* – jeden z najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Infekcje wywoływane przez *S. aureus* mogą mieć postać zakażenia miejscowego (głównie infekcje skóry i tkanki podskórnej przebiegające z wytworzeniem wydzieliny ropnej – zapalenie mieszków włosowych, czyraki, jęczmień, ropień, liszajec zakaźny, zakażenie miejsca operowanego), zakażenia tkanek i narządów (zapalenie płuc, zapalenie wsierdza lub zapalenie szpiku kostnego) lub zakażeń oraz zatrueń spowodowanych toksynami gronkowcowymi. Wyróżnia się wiele różnych toksyn gronkowców odpowiedzialnych za specyficzne choroby, m.in. wstrząs toksyczny jest wywoływany przez gronkowcową toksynę wstrząsu toksycznego – TSST (ang. *toxic shock syndrome toxin*), a zatrucia pokarmowe są indukowane enterotoksynami gronkowcowymi (Atchade i in., 2024).

Przykładem gronkowca koagulazo-ujemnego jest gronkowiec naskórkowy – *S. epidermidis* (Beck i in., 2024). Najczęściej prowadzi on do zakażeń u osób, u których proces terapeutyczny lub diagnostyczny przebiegł z wprowadzeniem do ustroju ciała obcego (na stałe lub czasowo), m.in. cewników (naczyniowych, urologicznych), endoprotez, rozruszników serca, sztucznych zastawek czy śrub chirurgicznych podczas operacji traumatologicznych. Obecne na powierzchni biomateriałów gronkowce produkują związki polimerowe, które inicjują tworzenie biofilmów. Ta specyficzna forma organizacji wzrostu bakterii zapewnia im zwiększoną ochronę przed degradacyjnym działaniem antybiotyków, środków dezynfekcyjnych oraz mechanizmów obronnych układu odpornościowego. Wiele gatunków bakterii posiada zdolność tworzenia biofilmu, który najczęściej ma charakter heterogeny, czyli jest złożony z drobnoustrojów wykazujących różnice fizjologiczne.

2.4.2. Formy walcowate (cyldryczne)

PAŁECZKI

Pałeczki to bakterie zaliczane zarówno do grupy bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Bordetella* spp.), jak i Gram-dodatnich (*Listeria* spp.).

Przykładem Gram-ujemnej pałeczki jest pałeczka okrężnicy – *Escherichia coli*, czyli przedstawiciel rodziny pałeczek jelitowych (*Enterobacteriaceae*). W warunkach fizjologicznych jest bakterią komensalną bytującą w jelicie grubym, w którym rozkłada resztki pokarmowe. Obecność *E. coli* w wodzie jest wskaźnikiem zanieczyszczeń fekalnych wody i żywności w badaniach sanitarno-epidemiologicznych. Szczepy *E. coli*, które są nieszkodliwe w jelicie, mogą być przyczyną zakażeń innych układów (w tym zakażeń oportunistycznych) i powodować m.in. ZUM, ZOMR u noworodków, zakażenia pooperacyjne czy sepsę (Hasbun, 2022). Enterotoksyny (główny czynnik zjadliwości obok zdolności do przylegania i adhezji do nabłonka przewodu pokarmowego) produkowane przez szczepy *E. coli* mogą być także przyczyną zatruc pokarmowych (Kaper i in., 2004). Gram-ujemną pałeczką jest także *Salmonella enterica* sv. Typhi – czynnik etiologiczny duru brzuszego. W budowie tego drobnoustroju wyróżnia się otoczkę chroniącą przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy gospodarza. Do grupy pałeczek Gram-ujemnych należy również *Pseudomonas aeruginosa*, tj. pałeczka ropy błękitnej. Czynniki ryzyka rozwoju zakażenia wywołanego przez *P. aeruginosa* są m.in. zaburzenie odporności, oparzenia, nowotwory, cukrzyca, obecność cewników i rurek intubacyjnych oraz długotrwała hospitalizacja. Bakterie te posiadają w swojej budowie oraz wytwarzają wiele czynników zjadliwości (m.in. rzęski, fimbrie, LPS czy egzotoksynę A i S) (Murray i in., 2016). *P. aeruginosa* jest przyczyną ostrych, nawracających zakażeń układu oddechowego – zwykle ciężkich i zagrażających życiu. Oprócz zakażeń układu oddechowego może powodować także zakażenia skóry i tkanek miękkich (zwykle zakażenia ran) czy układu moczowego (często po zabiegu cewnikowania pęcherza moczowego). Gram-ujemnymi pałeczkami są także bakterie z rodzaju *Proteus*, np. *P. mirabilis* oraz *P. vulgaris*, które są składową fizjologicznej mikrobioty jelitowej. Niestety na skutek antybiotykoterapii i w konsekwencji rozwoju dysbiozy jelitowej drobnoustroje te bardzo często są odpowiedzialne za rozwój zakażeń poza przewodem pokarmowym. Najczęstszą przyczyną zakażeń jest *P. mirabilis* – odpowiedzialny za rozwój zakażenia układu moczowego (szczególnie u osób cewnikowanych) – jest on odpowiedzialny za ok. 5% wszystkich zakażeń szpitalnych.

Bordetella pertussis to pałeczka, która jest chorobotwórcza wyłącznie dla człowieka i wywołuje krztusiec (inaczej koklusz). Czynnikiem chorobotwórczości *B. pertussis* o najwyższym znaczeniu jest produkowana przez nią białkowa toksyna krztuścowa, która powoduje zaburzenia funkcji komórek nabłonka dróg oddechowych, co skutkuje napadami kaszlu i świstem wdechowym, określanym jako „pianie koguta” lub „szczekanie psa”, utrzymującymi się nawet do kilku miesięcy (Ernst, 2022).

Przykładem Gram-dodatniej pałeczki jest *Listeria monocytogenes* wywołująca listeriozę. Ta urzęsiona peritrichalnie, względnie wewnątrzkomórkowa bakteria nie produkuje, podobnie jak inne pałeczki, spor. Ze względu na bardzo dużą odporność na niesprzyjające warunki środowiska *L. monocytogenes* jest bardzo szeroko rozpowszechniona w środowisku. Listerioza najczęściej rozwija się na skutek spożycia produktów mlecznych niepasteryzowanych, niedomytych surowych warzyw i owoców czy surowego mięsa (Koufakis i in., 2015). Rozwija się najczęściej u osób starszych, osób z obniżoną odpornością oraz kobiet w ciąży i noworodków. Listerioza najczęściej przebiega pod postacią zakażenia krwi (bakteriemii) lub sepsy, ZOMR lub ropni mózgu. Rozwój listeriozy może być przyczyną poronień, nieprawidłowego przebiegu ciąży oraz powstawania wad rozwojowych u noworodków. Innym przykładem Gram-dodatniej pałeczki jest *Cutibacterium acnes* (wcześniej znana jako *Propionibacterium acnes*) – beztlenowa bakteria wchodząca w skład fizjologicznej mikrobioty skóry, przewodu pokarmowego, oddechowego oraz dróg moczowo-płciowych. Drobnoustrój ten może przyczyniać się do rozwoju trądziku poprzez blokowanie gruczołów łojowych i wywoływanie stanu zapalnego mieszków włosowych. To z kolei może prowadzić do tworzenia zaskórników, wyprysków i stanów zapalnych skóry. U osób z obniżoną odpornością *C. acnes* może doprowadzić do rozwoju zapalenia wsierdza oraz ZOMR (Vasam i in., 2023).

Laseczki to Gram-dodatnie bakterie, wykazujące zdolność wytwarzania przetrwalników (spor), wśród których wyróżnia się bakterie wywołujące choroby u ludzi – szczególnie tlenowe bakterie z rodzaju *Bacillus* oraz beztlenowe z rodzaju *Clostridium*.

W obrębie rodzaju *Bacillus* na uwagę zasługują dwa gatunki: *B. anthracis* (laseczka wąglika) oraz *B. cereus* (laseczka woskowa), odpowiadające za ciężkie zakażenia u ludzi. Cechą charakterystyczną *B. anthracis* jest zdolność do tworzenia endospor, które umożliwiają przetrwanie w niesprzyjających warunkach. Przetrwalniki *B. anthracis*, zarówno w formie proszku, jak i aerozolu, były wykorzystywane jako broń biologiczna. *B. anthracis* jest czynnikiem etiologicznym wąglika – choroby odzwierzęcej, którą człowiek zakaża się okazjonalnie podczas bezpośredniego kontaktu z chorym zwierzęciem lub pośrednio poprzez skażone produkty odzwierzęce. Czynnikiem zjadliwości *B. anthracis* są m.in. silna, trójskładnikowa toksyna białkowa oraz unikatowa otoczka obecna wyłącznie w warunkach *in vivo*. Wyróżnia się trzy formy wąglika: skórny (95% wszystkich przypadków wąglika; przebiega z charakterystycznymi czarnymi, bolącymi strupami najczęściej na twarzy, szyi czy dłoniach), żołądkowo-jelitową (rzadka, ale wysoce śmiertelna forma – 25% przypadków zakończonych zgonem; wśród objawów klinicznych wyróżnia się gorączkę z dreszczami, obrzęk szyi, chrypę, bolesne przełykanie oraz nudności i wymioty) oraz oddechową/płucną (początkowy przebieg z rozwojem objawów grypopodobnych, następnie dochodzi do pogorszenia stanu chorego – rozwoju obrzęku płuc, niewydolności oddechowej czy sepsy) (Pohanka, 2020). Z kolei *B. cereus* jest gatunkiem względnie patogennym, odpowiedzialnym za wywoływanie zakażeń przewodu pokarmowego (najczęściej w postaci zapalenia żołądka i jelit), narządu wzroku czy rozwoju sepsy. Formy wegetatywne i ich endospory licznie występują w środowisku oraz produktach spożywczych – charakterystycznym sposobem zakażenia jest spożycie produktów zbożowych (głównie ryżu). Czynnikiem wirulencji *B. cereus* jest przede wszystkim wytwarzanie enterotoksyn (odpowiedzialne za rozwój zatruc pokarmowych mogących przyjmować postać wymiotną lub biegunkową).

Do rodzaju *Clostridium* zalicza się Gram-dodatnie, beztlenowe laseczki wytwarzające endospory, w jego obrębie natomiast wyróżnia się ponad 200 różnych gatunków, z czego wyłącznie niektóre są patogenne dla człowieka, m.in. *C. perfringens* (laseczka zgorzeli gazowej), *C. tetani* (laseczka tężca), czy *C. botulinum* (laseczka jadu kiełbasianego). Oprócz zdolności do wytwarzania przetrwalników chorobotwórczość tych bakterii związana jest także z namnażaniem w warunkach beztlenowych oraz wydzielaniem licznych toksyn i enzymów. *C. perfringens* jest laseczką bytującą głównie w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt (mikrobiota fizjologiczna), wywołującą zgorzel gazową (chorobę przebiegającą z martwicą mięśni lub tkanki łącznej oraz wytworzeniem gazu) (Grenda i in., 2023). Zakażenie *C. perfringens* jest najczęściej powikłaniem urazu, w wyniku którego doszło do zabrudzenia rany ziemią zawierającą przetrwalniki tej bakterii (mimo bardzo częstego zanieczyszczenia ran *C. perfringens* do rozwoju zgorzeli gazowej dochodzi jedynie u 1–2% przypadków – ryzyko jej rozwoju rośnie w przypadku zmniejszenia dostępności tlenu w tkankach, np. w przypadku niedokrwienia tkanek, m.in. w przebiegu cukrzycy czy oparzeń). Do objawów klinicznych zakażenia należą: ból, obrzęk i tkiwość tkanek, następnie dochodzi do obrzęku mięśni, rozwoju krwotocznych pęcherzy z brązową zawartością o słodkawej woni oraz rozwoju odmy podskórnej. Objawowe zakażenie może zostać powikłane niewydolnością wielonarządową. Potwierdzenie rozwoju zgorzeli gazowej wymaga zawsze pilnej interwencji chirurgicznej (usunięcie martwych tkanek) oraz wdrożenia antybiotykoterapii.

C. tetani jest Gram-dodatnią beztlenową laseczką wywołującą tężec. Bakteria ta wytwarza endospory zlokalizowane na końcu komórki, co nadaje jej charakterystyczny wygląd „palców dobosza / palców pałeczkowatych” lub rakiety tenisowej w obrazie mikroskopowym. Endospory laseczek *C. tetani* występują w glebie, ale także w przewodzie pokarmowym zwierząt. Do zakażenia dochodzi najczęściej poprzez zanieczyszczenie rany ziemią zawierającą przetrwalniki *C. tetani*. Objawy kliniczne choroby są wywoływane przez egzotoksyny, w tym tetanospazminę (neurotoksyna) oraz tetanolizynę (hemolizyna). Choroba może przybierać kilka postaci – uogólnioną (charakteryzuje się skurczem mięśni żuchwy oraz mięśni pleców, wzmożoną potliwością oraz ślinotokiem; objawem charakterystycznym jest grymas twarzy tzw. uśmiech sardoniczny),

miejscową (porażenie mięśni w miejscu urazu) lub noworodkową (u noworodków, których matki nie były uodpornione na tężec; występuje zazwyczaj w krajach rozwijających się). Leczenie obejmuje m.in. oczyszczenie miejsca zakażonego oraz podaż antytoksyny przeciwtężcowej (Megighian i in., 2021). Jako profilaktykę zachorowania na tężec stosuje się szczepienia ochronne, które w Polsce są obowiązkowe oraz refundowane do 19. roku życia.

Do Gram-dodatnich, beztlenowych laseczek wytwarzających przetrwalniki zalicza się również *C. botulinum*, czyli laseczkę jadu kiełbasianego. Endospory *C. botulinum* występują na całym świecie w glebie i zbiornikach słodko- i słonowodnych. Dotychczas opisano siedem toksyn botulinowych, spośród których cztery powodują zatrucia u ludzi. Dawka śmiertelna toksyny botulinowej dla człowieka wynosi 30 ng. Toksyna po wchłonięciu do krwi powoduje zahamowanie uwalniania acetylocholino i prowadzi do wiotkiego porażenia mięśni oraz zaburzenia funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego (Rawson i in., 2023). Do rozwoju botulizmu, czyli zatrucia jadem kiełbasianym, dochodzi najczęściej poprzez spożycie niewłaściwie sterylizowanych konserw lub przetworów. W ramach leczenia chorym podaje się antytoksynę przeciwbotulinową, wdraża antybiotykoterapię oraz przeprowadza zabiegi mające na celu usunięcie toksyny botulinowej z przewodu pokarmowego, np. płukanie żołądka.

2.4.3. Formy spiralne/skręcone

Do form spiralnych bakterii zalicza się przecinkowce, śrubowce i krętki.

PRZECINKOWCE

Przecinkowce swoją budową przypominają zakrzywione pałeczki. Typowym gatunkiem bakterii należących do przecinkowców, które wywołują zakażenia u człowieka, jest *Vibrio cholerae* (przecinkowiec cholery) – czynnik etiologiczny cholery. *V. cholerae* to Gram-ujemna bakteria poruszająca się dzięki pojedynczej rzęście umieszczonej na biegunie komórki (urządzenie monotrychalne). Do czynników wirulencji przecinkowca cholery zalicza się produkcję enterotoksyny (toksyna cholery – główna przyczyna obfitej biegunki w przebiegu choroby), obecność adhezyn (pod postacią fimbrii; adhezya bakterii do śluzówki jelita) czy mucynazy (enzymu rozkładającego składnik śluzu ochronnego jelit) (Dominguez i in., 2024). *V. cholerae* bytuje w przewodzie pokarmowym człowieka, jest zdolna do przeżycia i namnażania się w wodzie. Do zakażenia człowieka dochodzi drogą fekalno-oralną, najczęściej poprzez spożycie nieprzeżetowanej, zanieczyszczonej ludzkimi odchodami wody lub żywności, rzadziej przez bezpośredni kontakt z chorym. Cholera występuje przede wszystkim w krajach ze złymi warunkami sanitarnymi oraz ograniczonym dostępem do uzdatnionej wody pitnej. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) około 75% osób zakażonych przecinkowcem cholery to nosiciele bezobjawowi. Głównym symptomem cholery jest wodnista biegunka przypominająca ryżowe popłuczyny o zapachu ryby. Choroba szybko prowadzi do odwodnienia i rozwoju kwasicy metabolicznej. Nieleczona cholera może w ciągu kilkunastu godzin doprowadzić do zgonu. Leczenie przyczynowe polega na wdrożeniu antybiotykoterapii, natomiast w zakres leczenia objawowego wchodzi odpowiednie nawadnianie pacjenta i leczenie zaburzeń elektrolitowych.

Innym przykładem przecinkowca jest *Vibrio vulnificus* – Gram-ujemna, oportunistyczna bakteria występująca w środowisku obszarów nadmorskich, w szczególności przy ujściach rzek. Do zakażenia dochodzi najczęściej po spożyciu surowych lub niedogotowanych owoców morza, takich jak ostrygi czy małże. Ponadto zakażenie może rozwinąć się w wyniku narażenia uszkodzonej skóry (rany, zadrapania, otarcia) na zanieczyszczone wody morskie, co jest szczególnie prawdopodobne u osób uczestniczących w aktywnościach wodnych lub pracujących w środowisku morskim. Szczególnie narażone na zakażenie *V. vulnificus* są osoby z obniżoną odpornością, osoby starsze oraz osoby z przewlekłymi chorobami, szczególnie wątroby lub układu krążenia. W niektórych przypadkach, szczególnie w zaawansowanych stadiach infekcji, zakażenie może prowadzić do ciężkich powikłań, takich jak sepsa.

KRĘTKI

Krętki to wydłużone, spiralnie zwinięte bakterie Gram-ujemne (jednak tą metodą barwią się słabo; lepszy efekt barwienia uzyskuje się barwiąc je metodą Giemsy lub Wrighta). Wymagania wzrostowe krętków są zróżnicowane: niektóre z nich do optymalnego wzrostu wymagają warunków beztlenowych, z kolei inne – warunków tlenowych. Zakres odpowiedniej temperatury do wzrostu krętków również jest zróżnicowany i waha się w przedziale 25–42°C. Przedstawicielami chorobotwórczych dla człowieka krętków są m.in. gatunki *Treponema pallidum* (czynn timeriologiczny kiły) czy *Borellia burgdorferi* (czynn timeriologiczny boreliozy).

T. pallidum jest uznawana za bakterię względnie beztlenową, której nie da się hodować w warunkach *in vitro*. Główną drogą szerzenia się kiły jest kontakt seksualny z osobą zakażoną (droga płciowa), niemniej drobnoustroje mogą przenikać również przez łożysko (transfer wertykalny; kiła wrodzona) lub drogą krwi (podczas przetoczenia krwi zakażonej krętkami bladymi – rzadko). Krętki przenoszone są głównie w początkowych stadiach choroby. Krętki blade są wrażliwe na wysychanie oraz działanie środków dezynfekcyjnych, zatem nie przenoszą się na urządzenia toaletowe (np. deskę sedesową). Kiłę nabytą dzieli się na kiłę wczesną (≤ 1 rok od zakażenia; obejmuje: okres I – kiła I-rzędowa, przebiega z pojawieniem się tzw. objawu pierwotnego (wrzód twardy), oraz okres II – kiła II-rzędowa, kiedy to pojawiają się zmiany skórne (osutki kiłowe), którym towarzyszą objawy grypopodobne) oraz kiłę późną (> 1 rok od zakażenia; kiła III-rzędowa – przewlekły stan zapalny obejmujący narządy wewnętrzne). Leczenie przyczynowe kiły obejmuje wdrożenie antybiotykoaterapii (penicylina) (Peeling i in., 2023).

Innym przykładem krętków jest gatunek *B. burgdorferi* wywołujący boreliozę (Strnad i in., 2023). Krętki *B. burgdorferi* przenoszone są na człowieka i niektóre zwierzęta przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Do zakażenia dochodzi w wyniku ukłucia przez zakażonego kleszcza i jego żerowania w skórze. Objawy choroby uzależnione są od stadium choroby i mogą się nakładać. Wyróżnia się stadium wczesne i stadium późne choroby. Stadium wczesne ograniczone obejmuje występowanie początkowych objawów grypopodobnych, pojawienie się rumienia wędrującego; stadium wczesne rozsiane (narządowe) natomiast obejmuje pojawienie się zapalenia stawów, mięśnia sercowego czy zapalenie układu nerwowego (neuroborelioza). Stadium późne choroby jest związane z rozwojem takich stanów jak przewlekłe zanikowe zapalenie skóry kończyn, przewlekłe zapalenie stawów czy przewlekłe zapalenie układu nerwowego. Podstawową rolę w diagnostyce boreliozy odgrywa diagnostyka serologiczna (ocena za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) swoistych przeciwciał w klasie IgM i IgG. Leczenie, w zależności od stanu pacjenta, obejmuje wdrożenie antybiotykoaterapii i leczenia objawowego. Nie istnieją szczepienia ochronne zapobiegające tej chorobie.

2.4.4. Inne formy

MACZUGOWCE

Przedstawicielami bakterii przyjmujących inne kształty są maczugowce *Corynebacterium* spp. Stanowią one dużą grupę Gram-dodatnich, maczugowatych bakterii wymagających do wzrostu warunków tlenowych lub względnie tlenowych. Maczugowce są szeroko rozpowszechnione w środowisku, a zdecydowana większość z nich należy do bakterii oportunistycznych. Najpowszechniejszym patogenem człowieka należącym do maczugowców jest *C. diphtheriae* (maczugowiec błonicy) – czynnik etiologiczny błonicy. Bakteria ta wytwarza silną egzotoksynę błoniczą, która odpowiada za rozwój objawów choroby. *C. diphtheriae* szerzy się drogą kropelkową lub poprzez kontakt bezpośredni. Toksyna błonicza hamuje syntezę białek, co skutkuje śmiercią komórek organizmu. Doprowadza do uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych oraz powstawania błon rzekomych. Błonica to choroba dotycząca zwykle górnych dróg oddechowych bądź skóry, czasem prowadząca do uszkodzenia serca, układu nerwowego czy nerek. Leczenie obejmuje podanie antytoksyny błoniczej, wdrożenie antybiotykoaterapii oraz leczenia objawowego. Profilaktyka obejmuje podanie skojarzonej szczepionki **DTP** przeciwko błonicy (*Diphtheria*), tężcowi (*Tetanus*) oraz krztuścowi (*Pertussis*). Szczepionka zawiera toksoid błoniczy, toksoid tężcowy oraz inaktywowane bakterie

Bordetella pertussis. W Polsce szczepionka DTP jest szczepieniem obowiązkowym. Inną formą preparatu chroniącego przeciwko błonicy, krztuścowi i tężcowi jest szczepionka **DTaP** z obniżoną zawartością antygenów krztuśca, zawierającą bezkomórkowy składnik tego patogenu, czyli toksoid krztuścowy. Oznaczenie „a” wskazuje na wariant acelularny, czyli bezkomórkowy.

PRĄTKI

Do rodzaju *Mycobacterium* zalicza się wolno rosnące (21 dni), tlenowe, niewytwarzające przetrwalników bakterie o specyficznej budowie ściany komórkowej (podrozdział 2.2.2. *Budowa ściany komórkowej bakterii kwasoopornych*), która zapewnia im oporność na czynniki takie jak wysuszenie, niskie i wysokie pH czy wysoką i niską temperaturę. Najbardziej znanymi gatunkami bakterii należącymi do prątków są m.in. prątek gruźlicy *M. tuberculosis* oraz prątek trądu *M. leprae*. *M. tuberculosis* jest czynnikiem etiologicznym gruźlicy, która szerzy się głównie drogą kropelkową (Natarajan i in., 2020). Głównym źródłem *M. tuberculosis* jest człowiek prątkujący, czyli wydalający prątki podczas oddychania, mówienia, a szczególnie podczas kaszlu (prątki gruźlicy znajdują się w drobnych kropelkach płwociny). Choroba może dotyczyć każdego narządu. Najczęściej gruźlica występuje w postaci płucnej. Postać pozapłucna/narządowa jest charakterystyczna dla osób z nabytym niedoborem odporności (AIDS, ang. *acquired immunodeficiency syndrome*). Prątki gruźlicy mogą przeżyć wiele lat wewnątrz makrofagów pęcherzyków płucnych, jednocześnie nie dając żadnych objawów choroby. W takim przypadku mówi się o zakażeniu latentnym. Obraz kliniczny gruźlicy jest zróżnicowany. Do objawów ogólnoustrojowych należą m.in.: ubytek masy ciała, nocne poty, podwyższona temperatura ciała czy złe samopoczucie. Wśród objawów gruźlicy płuc wymienia się przewlekły, produktywny kaszel (z odkrztuszaniem śluzowej, ropnej wydzieliny), krwioplucie czy duszności. Rozpoznanie gruźlicy obejmuje diagnostykę obrazową (zdjęcia rentgenowskie, RTG klatki piersiowej), próbę tuberkulinową czy testy oparte na wydzielaniu interferonu. Jednak w celu potwierdzenia rozpoznania gruźlicy niezbędne jest wykonanie badania mikrobiologicznego mającego na celu stwierdzenie obecności prątków w badanym materiale klinicznym (metodą rozmazu albo hodowli). U osób z podejrzeniem gruźlicy płuc podstawowym materiałem do badania jest płwocina. Leczenie gruźlicy obejmuje stosowanie leków przeciwgruźliczych (np. ryfampicyna czy izoniazyd) i przeciwzapalnych. W Polsce od 1955 roku szczepienia przeciwko gruźlicy (szczepionka BCG – *Bacillus Calmette–Guérin*) są obowiązkowe. Szczepionka ta zawiera żywe, atenuowane prątki bydlęce *M. bovis*. Od 2019 roku szczepionka powinna być obowiązkowo podana dziecku w pierwszej dobie życia, przed wypisaniem ze szpitala.

Patogennym dla człowieka jest także gatunek *M. leprae* – czynnik etiologiczny trądu, którego głównym źródłem jest chory człowiek (Sugawara-Mikami i in., 2022). Najczęściej do zakażenia dochodzi przez błony śluzowe i skórę, czasami także drogą kropelkową. U 95% osób mających kontakt z *M. leprae* choroba nie rozwija się. Trąd występuje głównie w strefie tropikalnej, najczęściej wśród osób żyjących w ubóstwie. W przebiegu choroby dochodzi do rozwoju ziarninowatych zmian obejmujących głównie nerwy obwodowe oraz skórę. Potwierdzenie diagnozy umożliwia badanie wycinka zmian skórnych lub wydzieliny z nosa (stwierdzenie obecności prątków kwasoopornych). Wykorzystanie w diagnostyce trądu testów serologicznych jest ograniczone ze względu na ich małą czułość i swoistość. Leczenie trądu obejmuje wdrożenie antybiotykoterapii na okres od 6 do 24 miesięcy. Dodatkowo pacjentom ordynowane są również glikokortykosteroidy i leki przeciwbólowe.

3. Hodowle mikroorganizmów

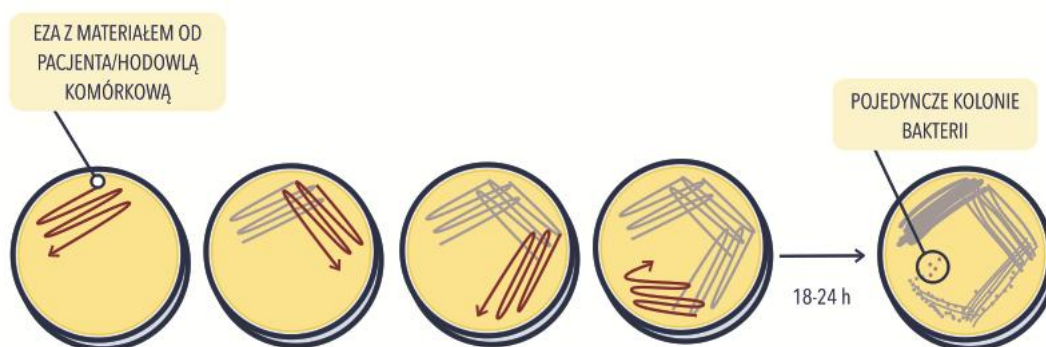
Ten rozdział omawia podstawowe zagadnienia związane z hodowlą drobnoustrojów – od metod uzyskiwania czystych kultur komórkowych, przez wymagania metaboliczne mikroorganizmów, po przykłady podłoży mikrobiologicznych służących do izolacji, namnażania i różnicowania drobnoustrojów.

3.1. Zakładanie hodowli drobnoustrojów

Prawidłowy wzrost i rozwój mikroorganizmów wymagają zapewnienia takich warunków środowiskowych, które odpowiadają ich potrzebom pokarmowym. Pobrane przez bakterie składniki są źródłem substancji budulcowych komórki, a także energii, która jest konieczna do rozmnażania i wzrostu. W mikrobiologii wyróżnia się dwa rodzaje hodowli drobnoustrojów: czyste i mieszane. W skład hodowli czystej wchodzi osobniki tego samego gatunku, natomiast w hodowli mieszanej wyróżnia się osobniki należące do różnych gatunków. W środowisku naturalnym bakterie najczęściej rosną w postaci hodowli mieszanych, skąd mogą być izolowane i wysiewane na podłoża namnażająco-wybiórcze, pozwalające na ich identyfikację. Zakładanie czystych hodowli umożliwia precyzyjne określenie cech morfologicznych drobnoustroju oraz pozwala na prowadzenie badań naukowych między innymi nad jego metabolizmem czy opornością na antybiotyki. W diagnostyce mikrobiologicznej czysta hodowla umożliwia potwierdzenie, który konkretnie patogen jest przyczyną zakażenia.

Wśród technik otrzymywania czystych kultur komórkowych wyróżnia się metody bezpośrednie i pośrednie. Bezpośrednie metody otrzymywania czystych kultur komórkowych opierają się na wykorzystaniu tzw. mikromanipulatora – urządzenia mikroskopowego, które jest wyposażone w szklaną kapilarę. Obecność kapilary pozwala na zasysanie z hodowli mieszanej jednej komórki drobnoustroju, która po przeniesieniu do jałowej pożywki dzieli się, dzięki czemu daje początek hodowli składającej się z osobników jednego gatunku. W ten sposób otrzymuje się czystą hodowlę komórkową. Znana jest również druga metoda (Lindnera), którą wykorzystuje się w przypadku hodowli większych drobnoustrojów, np. drożdży, które są widoczne pod mikroskopem bez zastosowania immersji.

Wśród metod pośrednich możemy wyróżnić metodę posiewu redukcyjnego płytek agarowych (ryc. 9), w której wykorzystuje się szalki Petriego zawierające podłoże wzrostowe zestalone agarem. W skład podłoża mogą wchodzić np. bulion i agar lub brzeczka i agar (odpowiednio dla bakterii i drożdży). Bulion to podłoże przygotowane najczęściej na bazie wyciągów mięsnych (np. wołowych), którego rodzaje opisano w podrozdziale 3.2. *Podłoża mikrobiologiczne*. Brzeczka to słodka ciecz powstała podczas warzenia piwa, uzyskana z ekstraktu słodowego (jęczmiennego) i wody. Posiew na płytce wykonywany jest za pomocą ezy – prostego przyrządu preparacyjnego, wykonanego z metalu lub plastiku, który zakończony jest pętelką służącą do pobierania i przenoszenia materiału. Posiew redukcyjny wykonywany jest w przypadku, gdy potrzebne są dobrze oddzielone od siebie kolonie, a inokulum zawiera bardzo dużo komórek. Pojęciem inokulum określa się niewielką ilość zawiesiny komórek bakterii lub zarodników grzybów służącą do założenia hodowli. W metodzie tej dochodzi do stopniowego „rozcieńczania” inokulum, które prowadzi się w taki sposób, by w każdej kolejnej posiewanej części płytki uzyskać malejącą liczbę komórek. Ważne jest to, żeby przed każdym kolejnym rozsianiem materiału biologicznego (kolejnym taktem) opalić ezę (jeśli jest zrobiona z metalu) w płomieniu palnika, a następnie odczekać, aż ostygnie. W przypadku ezy wykonanej z plastiku po każdym takcie należy umieścić ją w pojemniku na odpady biologiczne i użyć nowej ezy do kolejnego kroku. Po inkubacji płytki w odpowiedniej temperaturze z każdej komórki (odpowiednio oddzielonej od pozostałych) wyrasta pojedyncza kolonia.



Rycina 9. Technika posiewu redukcyjnego za pomocą ezy na tzw. cztery takty (rys. D. Szmajda-Krygier)

3.2. Podłoża mikrobiologiczne

W diagnostyce mikroorganizmów do ich namnażania i identyfikacji w warunkach *in vitro* służą podłoża hodowlane (inaczej pożywki). Są to mieszaniny odpowiednio dobranych składników, zawierające związki odżywcze, które pozwalają na wzrost i namnażanie się wielu rodzajów lub jednej grupy mikroorganizmów. Pożywki do hodowli bakterii i grzybów ze względu na konsystencję można podzielić na płynne (bez dodatku czynnika zestalającego, tj. żelującego) i stałe, zawierające w składzie agar (1–2%). Pożywki przygotowuje się w sterylnych pomieszczeniach z wykorzystaniem komponentów, które pozwolą zachować skład ilościowy i jakościowy oraz jałowość. Można wykonać je samodzielnie przy wykorzystaniu podłoży sypkich, czyli suchych mieszanek substancji odżywczych. Dostępne są również na rynku gotowe podłoża mikrobiologiczne, które pozwalają zaoszczędzić czas wymagany do ich przygotowania. Co ważne, nie ma jednego uniwersalnego podłoża umożliwiającego wzrost wszystkim drobnoustrojom, a dla niektórych gatunków bakterii (np. *T. pallidum*) nie opracowano nadal odpowiedniego podłoża.

Idealne podłoże mikrobiologiczne charakteryzuje się:

- odpowiednim składem zapewniającym optymalny wzrost i namnażanie drobnoustrojów (tj. zawiera źródła pierwiastków biogennych i energii, sole mineralne, m.in. wapnia lub manganu, odpowiednie makro- i mikroelementy),
- obecnością składników różnicujących i/lub wybiórczych w przypadku podłoży specjalnych,
- jałowością niezbędną w prowadzeniu hodowli,
- odpowiednim odczynem pH (w hodowlach większości bakterii najczęściej 7,2–7,4) i potencjałem redox,
- izotonicznością, która jest uzyskiwana poprzez stosowanie NaCl.

Podłoża bakteriologiczne można podzielić ze względu na skład chemiczny, konsystencję czy zawartość substancji odżywczych, jednak ze względów praktycznych najczęściej wykorzystywany w diagnostyce mikrobiologicznej jest podział podłoży pod kątem ich zastosowania. Wyróżniamy zatem podłoża:

- transportowe – używane do transportu próbek materiału klinicznego i szczepów bakterii do laboratorium; utrzymują one żywotność bakterii, ale nie pozwalają na ich namnożenie; najszerszej stosowanymi podłożami transportowymi są uniwersalne podłoża Stuarta i Amiesa oraz (stosowane głównie do próbek kału) podłoże Cary'ego-Blaira;
- namnażające – bogate, stwarzające dogodne warunki dla wzrostu wielu rodzajów bakterii; przykładami pożywek namnażających są bulion odżywczy, w skład którego wchodzi wyciąg z mięsa i woda peptonowa (pepton, NaCl i woda), oraz bulion glukozowy, który różni się od bulionu odżywczego jedynie dodatkiem glukozy;

- selektywne – inaczej wybiórczo-namnażające, z dodatkiem substancji umożliwiających wzrost określonego rodzaju/gatunku drobnoustroju i hamujących wzrost pozostałych; przykładami pożywek selektywnych są:
 - agar czekoladowy, w skład którego wchodzi zlizowana krew (wzbogacająca pożywkę o dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy NAD⁺, hem); umożliwia wzrost wymagającym bakteriom takim jak *Haemophilus influenzae*, *N. gonorrhoeae*),
 - podłoże SS (agar *Salmonella–Shigella*) to pożywka, która poza czynnikami wzrostu (agarem, bulionem mięsnym, peptonem) posiada składniki różnicujące – chlorek sodowy, tiosiarczan i cytrynian sodowy oraz barwniki (czerwień obojętną, zieleń brylantową); innymi składnikami są laktoza i dezoksycholan sodu; pożywka umożliwia wzrost *Salmonella* spp. i *Shigella* spp.; na skutek wytwarzania H₂S przez szczepy *Salmonella* spp. wyrastają kolonie z zaczernionym środkiem, podczas gdy kolonie *Shigella* spp. pozostają bezbarwne;
- różnicujące – są odpowiednie dla wielu bakterii, jednak obecne w ich składzie czynniki różnicujące (inaczej: indykatory), umożliwiają ich rozróżnienie na podstawie identyfikacji określonych cech, np. hemolizy czy fermentacji danego cukru; przykładami są agar Columbia, podłoże Kliglera czy podłoże płynne Stuarta;
- wybiórczo-różnicujące – umożliwiają różnicowanie określonych rodzajów/gatunków bakterii oraz hamują wzrost flory towarzyszącej; należą do nich:
 - agar MacConkeya – czynnikami wybiórczymi w tej pożywce są sole żółciowe, fiolet krystaliczny, natomiast czynniki różnicujące to laktoza i czerwień obojętna; pożywka przeznaczona jest do wzrostu bakterii Gram-ujemnych takich jak *Enterobacteriaceae*; kolonie bakterii rozkładających laktozę (laktozo-dodatnich) przyjmują barwę różową, zaś nierozkładających – pozostają niewybarwione,
 - podłoże Wilsona–Blair (WB) – czynnikami wybiórczymi w składzie podłoża są zieleń brylantowa oraz siarczyny bizmutu, a czynnikami różnicującymi – siarczany żelaza i bizmutu; pożywka przeznaczona jest do wzrostu bakterii z rodzaju *Salmonella*: *S. typhi* – kolonie są czarne z metalicznym połyskiem, czarne zabarwienie podłoża, *S. enteritidis* – kolonie czarne, bez połysku, czarne zabarwienie podłoża, pozostałe gatunki *Salmonella* – kolonie jasnozielone, brak zabarwienia podłoża, wzrost pozostałych pałeczek jelitowych jest silnie zahamowany, ewentualnie drobne, brunatne kolonie,
 - podłoże Chapmana – podłoże wybiórczo-różnicujące dla bakterii Gram-dodatnich; czynniki wybiórcze w składzie to NaCl (7,5%) i azydek sodu (65 mg/l), a różnicujące to mannitol i kazeina; pożywka jest przeznaczona do wzrostu bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz ich różnicowania; podłoże wokół szczepów gronkowców koagulazo-dodatnich (np. *S. aureus*) rozkładających mannitol zmienia zabarwienie z różowego na żółte, natomiast gronkowce koagulazo-ujemne nie powodują zmiany zabarwienia podłoża.

Pożywką używaną najczęściej do hodowli grzybów jest podłoże Sabouraud zawierające, poza czynnikami niezbędnymi do wzrostu grzybów (tj. glukozą, peptonem), antybiotyki (np. chloramfenikol) służące do zahamowania wzrostu bakterii. Drożdże można łatwo hodować z wykorzystaniem pożywki z ekstraktem drożdżowym lub brzożki słodowej.

W diagnostyce mikrobiologicznej wykorzystuje się również podłoża chromogenne, które zawierają składniki metabolizowane przez bakterie i nadające tym samym koloniom drobnoustrojów określone zabarwienie. Znajduje to szczególne zastosowanie podczas identyfikacji przyczyny zakażenia dróg moczowych. Natomiast do kontroli czystości mikrobiologicznej sprzętów, powierzchni roboczych i stołów (np. w zakładach produkcyjnych) stosuje się płytki odciskowe/kontaktowe. Płytki dostępne są dla wielu rodzajów bakterii i grzybów oraz dodatkowo zawierają substancje inaktywujące środki używane do dezynfekcji powierzchni.

Do przygotowania podłoży stałych niezbędne jest dodanie agaru, który spowoduje zestalenie upłynnionego podłoża mikrobiologicznego. Agar jest pozyskiwany z krasnorostów morskich i zawiera galaktozę, resztę siarczanową oraz jony Ca^{2+} oraz Mg^{2+} . Upływnia się w temperaturze 95–99°C, natomiast w temperaturze o zakresie od 45°C do 49°C ulega zestaleniu. Poza niektórymi bakteriami morskimi mikroorganizmy nie wykorzystują agaru jako składnika odżywczego, dlatego jest on powszechnie stosowany do zestalania podłoży. Czynnikiem zestalającym może być również żelatyna, substancja o charakterze białkowym pochodzenia zwierzęcego, jednak w przeciwieństwie do agaru żelatyna jest hydrolizowana przez drobnoustroje o właściwościach proteolitycznych.

W celu zapewnienia drobnoustrojom odpowiednich warunków do wzrostu należy wziąć pod uwagę:

- dostęp tlenu – w zależności od sposobu oddychania mikroorganizmów należy zapewnić odpowiednie warunki prowadzonej hodowli; w obecności tlenu atmosferycznego rosną dobrze bakterie tlenowe, a drobnoustroje beztlenowe wyrastają w obecności 0,5–1% tlenu; do wzrostu bakterii mikroaerofilnych wymagane jest zapewnienie 5% tlenu i 10% CO_2 ,
- temperaturę otoczenia – hodowle większości drobnoustrojów chorobotwórczych prowadzi się w temperaturze 37°C,
- wilgotność.

W zależności od tempa namnażania drobnoustrojów czas prowadzenia hodowli do momentu uzyskania ich wzrostu w postaci kolonii wynosi od 18 do 24 godzin dla większości bakterii chorobotwórczych oraz nawet do kilku tygodni w przypadku prątków gruźlicy.

Podczas identyfikacji bakterii opisuje się przede wszystkim cechy morfologiczne kolonii wyrosłych na podłożu stałym oraz cechy hodowlane odnoszące się do ich wzrostu na podłożach płynnych lub w hodowli kłutej na słupku żelatynowym. Kolonia to zespół bakterii powstający z jednej komórki bakteryjnej na skutek jej podziałów. Kolonie widoczne są gołym okiem jako skupiska o charakterystycznym wyglądzie, który jest uzależniony od takich czynników, jak np. rodzaj podłoża mikrobiologicznego, czas trwania inkubacji i temperatura. W tabeli 2 przedstawiono wybrane elementy, na które należy zwrócić uwagę przy opisie kolonii.

Tabela 2. Cechy kolonii na podłożach mikrobiologicznych

CECHA	OPIS
kształt	okrągły, owalny, nieregularny, gwiazdkowaty, promienisty
brzeg	równy, falisty, zatokowaty, postrzępiony, nitkowaty
powierzchnia	gładka, szorstka, pomarszczona, nitkowata, gruboziarnista, matowa, błyszcząca
wyniosłość ponad powierzchnię	płaska, lekko wzniesiona, wypukła, stożkowata, kraterowata
przejrzystość	przejrzysta, mętna, opalizująca

Dodatkowo należy zwrócić uwagę na kolor kolonii i ewentualne zmiany zabarwienia bądź przejaśnienia podłoża w jej otoczeniu oraz zapach (jeśli jest obecny, należy określić jego intensywność i czy jest charakterystyczny). Ocenie poddaje się również konsystencję kolonii, którą sprawdza się za pomocą ezy i określa jako zwartą, luźną, lepłą, śluzowatą bądź suchą. Ponadto na podłożach zawierających krew określa się obecność hemolizy: α – zazielenienie podłoża, β – całkowita liza krwinek / przejaśnienie lub γ – brak hemolizy.

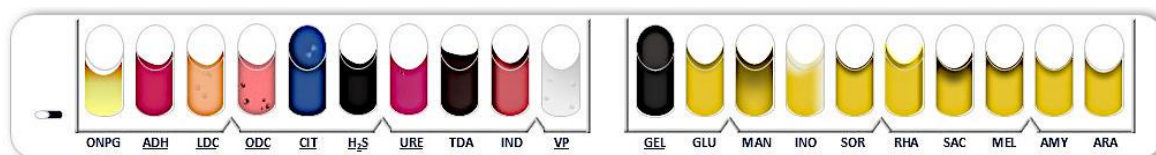
Pośród grzybów hodowanych na podłożach mikrobiologicznych najszybciej wzrastają drożdże (już po 18–72 godzinach) od posiewu, zaś większość grzybów strzępkowych potrzebuje od 3 do 5 dni, podczas gdy grzyby dimorficzne i dermatofity wymagają kilku tygodni inkubacji.

4. Testy biochemiczne. Metody oceny lekowrażliwości

W tym rozdziale opisano dalsze postępowanie z materiałem klinicznym pobieranym od pacjenta. Oprócz wykonania preparatu mikroskopowego czy założenia hodowli drobnoustrojów w diagnostyce mikrobiologicznej mają również zastosowanie testy biochemiczne, które opierają się głównie na ocenie zdolności do rozkładu substratów za pomocą enzymów komórkowych. Ponadto przedstawiono metody oceny lekowrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki, które są kluczowe w doborze leczenia przeciwdrobnoustrojowego.

4.1. Analiza biochemiczna

Szeregi biochemiczne stosuje się do identyfikacji bakterii należących do tego samego rodzaju lub rodziny. Przykładem są testy API Listeria lub API 20E (do wykrywania pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, m.in. *Salmonella* spp.). Na biochemiczny szereg identyfikacyjny składają się mikroprobówki zawierające odwodnione substraty. Do każdej z nich wprowadza się zawiesinę bakteryjną, która w wyniku produkcji enzymów powoduje przemianę substratu do barwnego produktu. Reakcje biochemiczne zachodzące w czasie inkubacji powodują zmiany zabarwienia powstałe samoistnie lub po dodaniu odczynnika wskaźnikowego. Odczytu wyników dokonuje się w oparciu o program komputerowy API Web Plus. Na rycinie 10 przedstawiono test API20E po inkubacji z hodowlą badanego drobnoustroju.



Rycina 10. Przykładowy wynik testu API20E (rys. P. Żelechowska)

4.2. Ocena lekowrażliwości

Elementem poprawnie przeprowadzonej diagnostyki mikrobiologicznej, oprócz identyfikacji czynnika etiologicznego, jest także ocena potencjału zastosowania środka przeciwdrobnoustrojowego w danym zakażeniu. W leczeniu zakażeń początkowo stosuje się tzw. terapię empiryczną, czyli terapię dobraną zgodnie z analizą wrażliwości na proponowany lek wszystkich gatunków bakterii mogących wywołać dany typ zakażenia oraz oceną skuteczności klinicznej leczenia proponowanym antybiotykiem. Ocena lekowrażliwości bakterii wyhodowanych z materiału pobranego od pacjenta umożliwia wprowadzenie tzw. terapii celowanej, zgodnej z profilem wrażliwości na leki wyhodowanego szczepu.

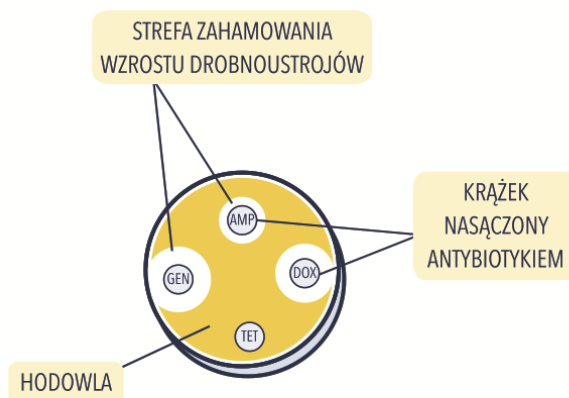
WAŻNE!

W ujęciu mikrobiologicznym izolat to drobnoustrój wyizolowany z określonego miejsca (np. z miejsca toczącego się zapalenia u pacjenta).

Do oznaczania lekowrażliwości na antybiotyki można zastosować jedną z poniższych metod:

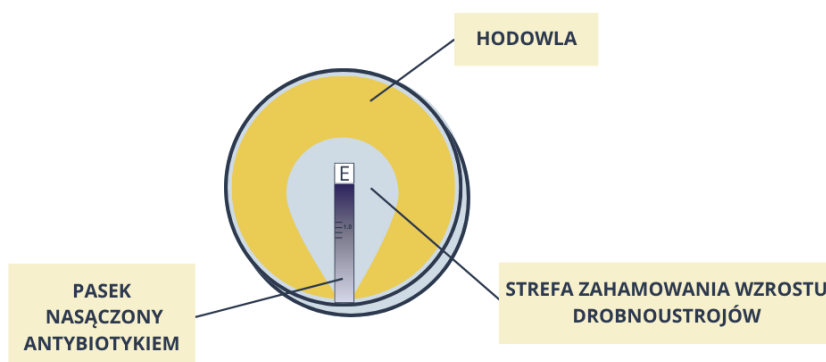
- dyfuzyjno-krążkową opracowaną w roku 1940 i stosowaną do dziś w wielu laboratoriach klinicznych. Polega ona na umieszczeniu na podłożu hodowlanym pokrytym równomiernie badanym mikroorganizmem (posiew na murawę) krążków z bibuły filtracyjnej (o średnicy około 6 mm) nasączonych antybiotykiem w ściśle określonym stężeniu. Lek dyfunduje do podłoża i powoduje całkowite zahamowanie lub osłabienie wzrostu drobnoustroju. Odczyt polega na zmierzeniu średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii dookoła krążka oraz skategoryzowanie ich na: wrażliwe (S – ang. *susceptible*), średniowrażliwe (I – ang.

intermediate) lub odporne (R – ang. *resistant*). Technika ta ma wiele zalet, między innymi łatwość wykonania czy niskie koszty, jest jednak obarczona błędami, między innymi brakiem rozróżnienia efektu bakteriostatycznego od bakteriobójczego oraz brakiem określenia minimalnego stężenia hamującego (MIC, ang. *minimum inhibitory concentration*) (ryc. 11);

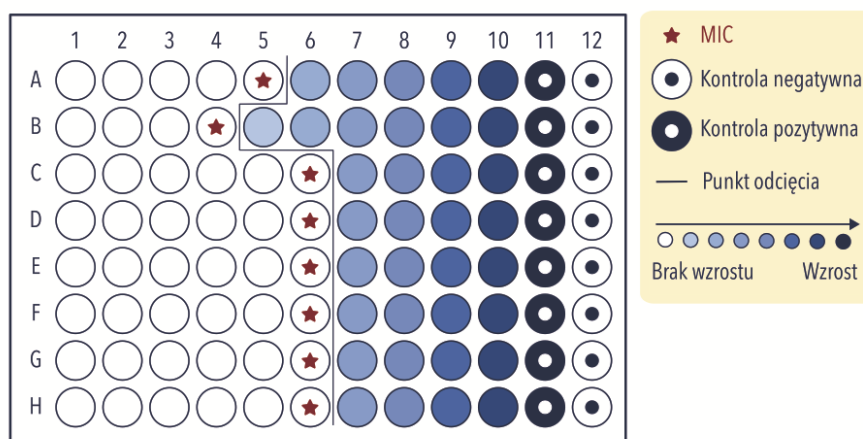


Rycina 11. Metoda dyfuzyjno-krążkowa oceny wrażliwości drobnoustroju na antybiotyki(i) (rys. D. Szmajda-Krygier)

- gradientową, dzięki której badany jest szeroki panel stężeń jednego antybiotyku. W tej technice, podobnie jak w metodzie dyfuzyjno-krążkowej, na podłoże zaszczepione drobnoustrojem nakładany jest pasek nasączony czynnikiem przeciwdrobnoustrojowym w gradiencie stężeń. Przy odczycie obserwuje się strefę zahamowania wzrostu, która przybiera kształt elipsy (stąd nazwa E-test, ang. *Epsilonmeter test*), a miejsce przecięcia powstałego kształtu z paskiem wyznacza minimalne stężenie hamujące. Zaletą metody jest możliwość wyznaczenia wartości MIC oraz określenie fenotypu oporności (ryc. 12). W niektórych wersjach pasków po jednej stronie znajduje się stałe stężenie inhibitora (np. inhibitora β -laktamaz), co umożliwia równoczesne badanie działania dwóch składników (np. antybiotyku + inhibitor);
- rozcieńczeniową, w której do podłoża płynnego lub stałego z antybiotykiem w określonym stężeniu dodaje się taką samą liczbę komórek bakteryjnych i ocenia wzrost w obecności antybiotyku. Technika seryjnych rozcieńczeń jest kluczowa do podania wskaźników laboratoryjnych oceniających wrażliwość danego drobnoustroju na leczenie, jednak metoda ta wymaga większych nakładów finansowych niż techniki wspomniane wyżej (ryc. 13).



Rycina 12. Metoda gradientowa oceny wrażliwości drobnoustroju na antybiotyki(i) (rys. D. Szmajda-Krygier)

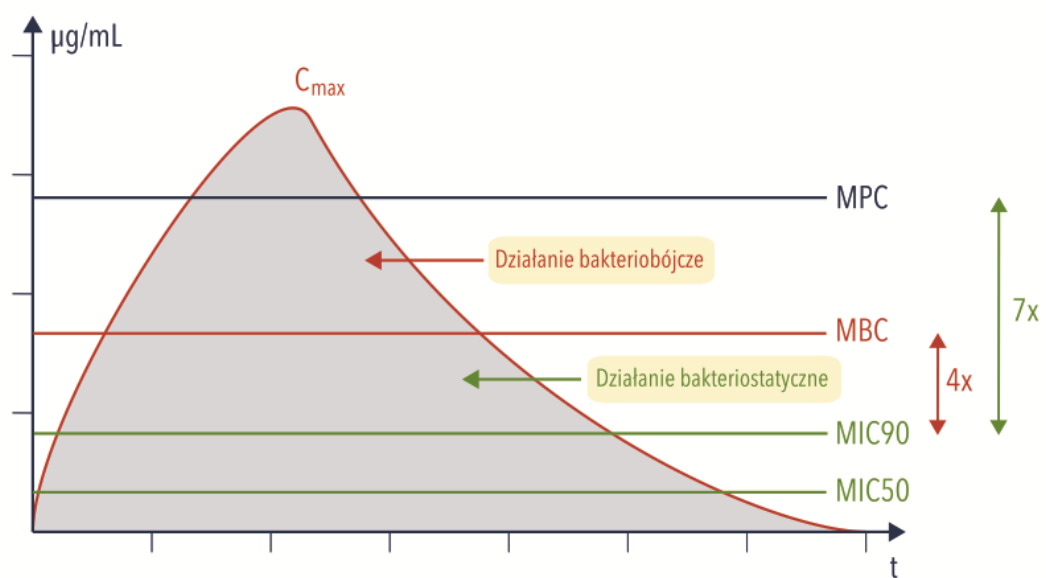


Rycina 13. Metoda rozcieńczeniowa oceny wrażliwości drobnoustroju na antybiotyki(i)
(rys. D. Szmaja-Krygier)

Wskaźniki laboratoryjne oceniające wrażliwość danego drobnoustroju na leczenie to:

- **MIC** – najniższe stężenie antybiotyku lub innego środka przeciwdrobnoustrojowego, które hamuje widoczny wzrost szczepu bakterii w warunkach laboratoryjnych;
- **MIC50** i **MIC90**, czyli najniższe stężenia leku przeciwbakteryjnego lub przeciwgrzybiczego, które hamują wzrost odpowiednio 50% i 90% badanych izolatów danego gatunku; te wartości odnoszą się tylko do działania bakterio- lub grzybobójczego danego leku;
- **MBC** (ang. *minimum bactericidal concentration*) to parametr wyznaczany po ustaleniu MIC, opisujący minimalne stężenie bakteriobójcze, czyli najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, prowadzące do zabicia 99,9% komórek bakteryjnych w warunkach *in vitro*. Stężenie wyjściowe badanego środka przeciwdrobnoustrojowego stosowane do oznaczenia MBC wyznaczane jest jako 100-krotność znanej wartości MIC. Analogiczne określenie **MFC** (ang. *minimum fungicidal concentration*) odnosi się do grzybów. Jeśli stężenie leku w surowicy krwi lub tkankach pacjenta jest wyższe niż MIC90, a niższe niż MBC lub MFC, to działanie leku uznawane jest za bakterio- lub grzybobójcze, natomiast gdy stężenie leku przekracza wartość MBC, wskazuje to na działanie bakteriobójcze preparatu. Wartość MBC/MFC jest średnio 4 razy wyższa niż MIC90;
- **MPC** (ang. *mutant prevention concentration*) to określenie odnoszące się do stężenia leku, które hamuje powstanie mutacji drobnoustrojów, zazwyczaj stężenie to jest 7 razy wyższe niż MIC90 (ryc. 14) (Schwarz, 2010; Kadeřábková, 2024).

W Polsce stosowane są zalecenia Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości **EUCAST** (ang. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), który opracowuje wytyczne dotyczące przeprowadzania badania oporności oraz dalszej interpretacji wyników. Polską instytucją odpowiedzialną za przedstawianie rekomendacji jest Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. Przydatne informacje można również znaleźć na stronie Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków.



Rycina 14. Wskaźniki laboratoryjne oceniające wrażliwość danego drobnoustroju na lek
(rys. D. Szmaida-Krygier)

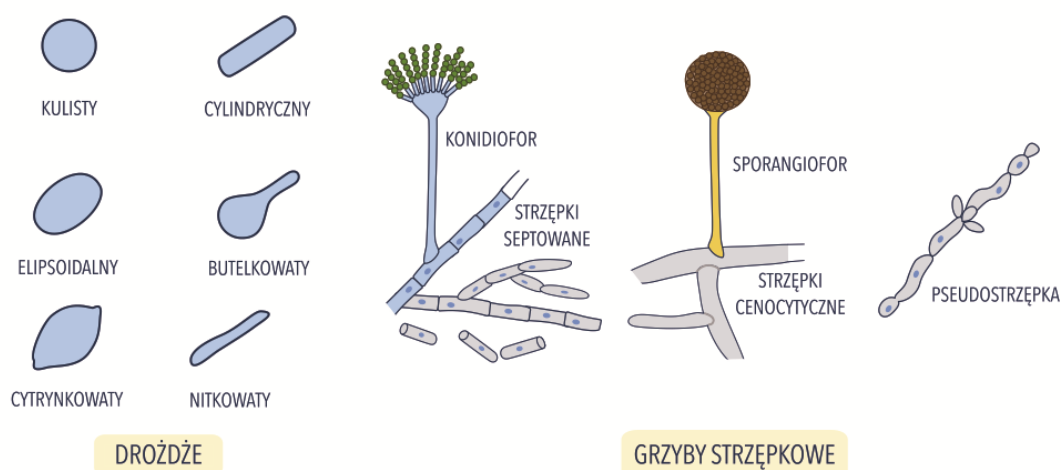
5. Morfologia grzybów mikroskopowych. Diagnostyka mykologiczna

W tym rozdziale poruszono zagadnienia związane z klasyfikacją systematyczną i morfologią grzybów mikroskopowych. Przedstawiono również negatywne oblicze ich działalności, czyli choroby, które wywołują u ludzi, psucie żywności czy niszczenie materiałów budowlanych.

5.1. Charakterystyka grzybów mikroskopowych

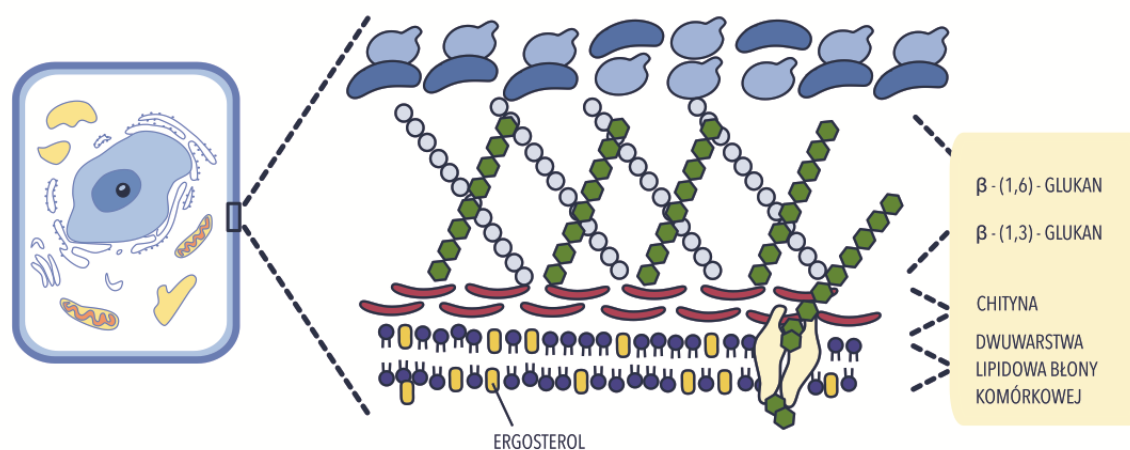
Według obecnie obowiązującej systematyki wszystkie grzyby (drożdże i pleśnie) są zaliczane do królestwa *Mycota* (Fungi), należącego do domeny *Eukaryota*, chociaż do 1969 roku były zaliczane do królestwa roślin z uwagi na obecność ściany komórkowej. Do tej pory znanych i opisanych jest 100 tys. gatunków grzybów, jednak szacuje się, że stanowią one jedynie 5% wszystkich gatunków występujących na Ziemi. Dane dotyczące przynależności systematycznej danego taksonu można znaleźć na stronach internetowych Index Fungorum i Mycobank (Zhou i May, 2022).

Grzyby to organizmy eukariotyczne, heterotroficzne, które do procesów życiowych potrzebują związków węgla i azotu. Grzybnia (*mycelium*) składa się ze splotu wielokrotnie rozgałęzionych strzępek, które mogą być podzielone septami (przegrodami) i tworzyć grzybnię wielokomórkową (np. u grzybów strzępkowych). U grzybów niższych (sprzężniaków) strzępki nie zawierają przegród poprzecznych, lecz w ich komórkach występuje wiele jąder i taką grzybnię określa się jako jednokomórkową (Macura, 2017a; Macura i Skóra, 2017). Do królestwa grzybów zaliczane są również drożdże występujące w postaci pojedynczych komórek. Ponadto przy zmianie warunków środowiska grzyby strzępkowe mogą występować w stadium saprofitycznym (w temperaturze 25–30°C) jako formy nitkowate, natomiast w wyższym zakresie temperatur (35–37°C) mogą przybierać formy drożdżopodobne (kuliste, owalne), to tzw. postać drożdżowa; dotyczy to również grzybów patogennych w stadium pasożytniczym (Macura, 2017b). Zjawisko to określa się jako dimorfizm temperatury/termiczny, a przedstawicielami grzybów dimorficznych chorobotwórczych dla człowieka są m.in. *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* i *Sporothrix schenckii* (ryc. 15).



Rycina 15. Formy morfologiczne grzybów (rys. D. Szmaida-Krygier)

Komórki grzybów zawierają organelle charakterystyczne dla organizmów eukariotycznych, jednak różnią się składem chemicznym ściany komórkowej, która u grzybów zbudowana jest z chityny oraz glukanów i innych wielocukrów (ryc. 16). Mannoproteiny, zlokalizowane na powierzchni warstwy glukanów w ścianie komórkowej grzybów (oznaczone na schemacie kolorem niebieskim), pełnią funkcję ochronną przed czynnikami zewnętrznymi, takimi jak enzymy lityczne czy toksyny. U niektórych gatunków patogennych biorą również udział w maskowaniu antygenów, co umożliwia im unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W błonach komórkowych grzybów zamiast cholesterolu występuje ergosterol – umożliwia to stosowanie środków przeciwgrzybiczych, których działanie polega na zaburzeniu jego syntezy. Materiałami zapasowymi występującymi w komórkach grzybów są glikogen (rezerwuarowy polisacharyd, którego obecność świadczy o dobrym odżywieniu komórek) i wolutyna o charakterze białkowym oraz tłuszcze (zawieszone w cytoplazmie lub wakuoli) (Macura i Skóra, 2017; Piotrowska i Żakowska, 2012; Słaba i Różalska, 2020).



Rycina 16. Ściana komórkowa grzybów (rys. D. Szmajda-Krygier)

Podstawą klasyfikacji grzybów jest sposób rozmnażania płciowego oraz kształt zarodników. Większość grzybów może rozmnażać się zarówno płciowo, jak i bezpłciowo. Najprostszą formą rozmnażania bezpłciowego jest podział prosty lub fragmentacja grzybni i tworzenie spor (zarodników). U grzybów strzępkowych zarodniki wytwarzane są przez komórki zarodnikotwórcze umieszczone na konidioforze, natomiast u grzybów sprężniowych (*Zygomycetes*) zarodniki produkowane są do wnętrza sporangium znajdującego się na sporangioforze. Drożdże rozmnażają się głównie poprzez pączkowanie polegające na utworzeniu się wypustki, do której po podziale wnika jedno jądro. Następnie, po przemieszczeniu się wypustki, utworzony pierścień z mikrotubul odcina komórkę potomną od macierzystej, a po jej oddzieleniu się – na komórce macierzystej pozostaje blizna. Liczba blizn wskazuje na wiek komórki oraz określa jej zdolności reprodukcyjne. Workowce (*Ascomycetes*) i sprężniaki mogą również wytwarzać formy rozmnażania płciowego – gamety (komórki płciowe) wykształcone na gametangiach (Dominiak i Lembicz, 2018; Kunicka i Rajkowska, 2012; Macura i Skóra, 2017).

5.2. Grzyby mikroskopowe jako czynniki etiologiczne chorób infekcyjnych

Choroby wywoływane przez grzyby klasyfikuje się jako alergię, grzybicę i mykotoksykozy. Wśród najważniejszych źródeł alergenów wyróżnia się grzyby z rodzaju *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Głównym alergenem *Alternaria alternata* jest Alt a 1, wykrywany w cytoplazmie zarodników i grzybni. Zarodniki są uwalniane do atmosfery w obecności wody, a ich stężenie wzrasta w czasie zwiększonej wilgotności powietrza oraz w pomieszczeniach zamkniętych, gdzie szczególnie często występują grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* czy

Trichoderma. Wielkość zarodników *Alternaria* ($30 \times 50 \mu\text{m}$) sprawia, że po wnikięciu drogami oddechowymi lokują się w ich górnej części. Z kolei *Cladosporium herbarum* jest grzybem powszechnie występującym w powietrzu, niemal przez cały rok. Zarodniki *C. herbarum* o wymiarach $3 \times 5 \mu\text{m}$ są w stanie dotrzeć do oskrzelików i pęcherzyków płucnych (Olsen i in., 2023; Abel-Fernández i in., 2023).

Pośród grzybów pleśniowych najczęstszym czynnikiem powodującym grzybicę jest *Aspergillus fumigatus*, którego rezerwuarem są zarówno zanieczyszczone przewody wentylacyjne, klimatyzacyjne, zawilgocone tynki, jak i skażona żywność, woda i rośliny. Do zakażeń dochodzi głównie drogą wziewną na skutek inhalacji zarodników i strzępek, rzadziej przez uszkodzoną skórę i śluzówki oraz drogą pokarmową. *Aspergillus* jest czynnikiem etiologicznym grzybic oportunistycznych określanymi jako aspergilozy, który u większości zdrowych osób jest eliminowany przez układ odpornościowy, podczas gdy u osób z chorobami płuc może indukować zakażenia inwazyjne. Po przeniknięciu do naczyń krwionośnych aspergiloza może ulec rozprzestrzenieniu do innych tkanek i narządów (Barabasz i Pikulicka, 2017).

Za rozwój grzybic skóry, paznokci i włosów odpowiadają grzyby z rodzaju *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, określane jako dermatofity, których cechą charakterystyczną jest zdolność do rozkładu i asymilacji keratyny (keratynofilność i keratynolityczność) (Baran i Szepietowski, 2018). Grzybicę wywoływane przez dimorficzne grzyby najczęściej występują w krajach Ameryki Środkowej i Południowej, Azji oraz Afryki, dlatego nazywa się je również grzybicami tropikalnymi. Coraz częściej stosowane leki immunosupresyjne, chemioterapia czy długotrwała antybiotykoterapia powodują zaburzenia ilościowe i/lub jakościowe mikrobioty przewodu pokarmowego, co przyczynia się do patologicznego namnażania się grzybów. Wśród drożdży odpowiedzialnych za grzybicę są m.in. grzyby z rodzaju *Candida*, *Malessezia* i *Cryptococcus* (Grondalska i Kmiecik, 2017; Jagielski i in., 2013). Grzyb *Candida albicans* stanowi stałą mikrobiotę człowieka, a do zakażeń dochodzi najczęściej na skutek przerostu *Candida* lub jego przeniesienia do innych miejsc w organizmie (zakażenie endogenne), co prowadzi do rozwoju kandydozy np. błon śluzowych lub dróg moczowych (Talapko i in., 2021). Również drożdże *Malessezia* stanowią naturalną mikrobiotę skóry człowieka, preferują środowisko o dużej zawartości lipidów. Na skutek rozrostu *Malassezia* na skórze zmiany mogą występować pod postacią łupieżu pstrego (jako plamy na skórze spowodowane nadmierną bądź niedostateczną pigmentacją) lub zapalenia mieszków włosowych (Czyżewska i in., 2018; Mahajan i Sahoo, 2016).

Grzyby są również zdolne do wytwarzania mykotoksyn – niskocząsteczkowych metabolitów wtórnych, które w niewielkich dawkach oddziałują toksycznie na organizm człowieka i zwierząt. Czynnikiem sprzyjającym produkcji mykotoksyn, poza uzdolnieniami metabolicznymi grzyba, są m.in. czas, temperatura, wilgotność, dostęp tlenu oraz obecność mikroelementów. Do zatrucia u ludzi dochodzi na skutek spożycia żywności zanieczyszczonej mykotoksynami (Barabasz i Pikulicka, 2017; Kowalska i in., 2017).

Grzyby odpowiedzialne są również za niszczenie materiałów budowlanych pochodzenia naturalnego oraz wyprodukowanych na bazie tworzyw sztucznych, a ich niekorzystne oddziaływanie na materiały budowlane określa się jako biodeteriorację. Rozwój tych drobnoustrojów jest uzależniony przede wszystkim od dostępności wody, co w połączeniu z nieskuteczną wentylacją lub nieodpowiednim odprowadzaniem wody może prowadzić do rozwoju pleśni w pomieszczeniach. Brak impregnacji biocydami drewna skutkuje rozwojem pleśni odpowiedzialnych za rozkład jego głównych składników, czyli celulozy i/lub ligniny, co określane jest jako zgnilizna drewna. W rezultacie dochodzi do zniszczenia ścian komórkowych drewna, a następnie obniżenia wytrzymałości materiału. Przykładami najbardziej szkodliwych grzybów odpowiedzialnych za rozkład materiałów drewnianych są *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana* i *Fibroporia vaillantii* (Gutarowska, 2013; Janusz i in., 2017).

Grzyby strzępkowe, ze względu na szybkie rozprzestrzenianie się, namnażanie oraz szereg mechanizmów enzymatycznych i adaptacyjnych, są zdolne do szerzenia się na wielu substratach naturalnych, w tym żywności.

5.3. Metody identyfikacji grzybów w materiałach biologicznych

Materiały biologiczne pobrane od pacjenta poddaje się ocenie w preparatach mikroskopowych, poprzez zakładanie hodowli zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* lub z wykorzystaniem testów biologii molekularnej.

- Preparaty bezpośrednie wykonuje się w 0,85% roztworze NaCl (również z dodatkiem 0,1% safraniny) ze wszystkich pobranych materiałów biologicznych – umożliwia to obserwację fragmentów grzybni, strzępek, zarodników w mikroskopie świetlnym. Tak wykonane preparaty należy obserwować po kilku lub kilkunastu minutach od pobrania materiału lub można przechować je w wilgotnej komorze w temperaturze 37°C.
- Preparaty trwałe wykonuje się z różnorodnych materiałów pobranych również podczas biopsji lub innych zabiegów operacyjnych. Rozmazy, po wysuszeniu i utrwaleniu w 70% alkoholu metylowym lub płynie Schaudinna, poddaje się barwieniu różnymi metodami w zależności od miejsca pobrania materiału. Pewne materiały biologiczne (tj. krew, płwocina, mocz, PMR) poprzez odwirowanie ulegają zagęszczeniu i następnie mogą być wykorzystane do hodowli *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach.
- Identyfikowane w Polsce gatunki grzybów chorobotwórczych hoduje się na podłożach: Sabourauda (zawiera 4% dekstrozę lub maltozę lub glukozę; 1% pepton; 1,8% agar) i Czapka (składa się z 0,3% NaNO₃; 0,1% K₂HPO₄; 0,05% MgSO₄ x 7 H₂O; 0,05% KCl; 0,001% FeSO₄ x 7 H₂O; 3% glukozy lub maltozy; 1,5% agaru).
- Wyhodowane na podłożach szczepy grzybów oznacza się przy użyciu gotowych testów diagnostycznych, np. API 20 C lub API 20 C AUX – są to gotowe do użycia szeregi biochemiczne, służące do identyfikacji grzybów na podstawie ich zdolności m.in. do przyswajania węgla z różnych związków, lub fermentacyjne. Testy umożliwiają zróżnicowanie w ciągu 24–72 godzin najczęściej występujących u ludzi gatunków grzybów chorobotwórczych (Kurnatowska i Khalid, 2018).

6. Zasady i aspekty prawne mikrobiologicznej analizy żywności. Analiza mikrobiologiczna produktów spożywczych. Część I

Ten rozdział przedstawia tok analizy mikrobiologicznej produktów spożywczych oraz opisuje metody oznaczania liczby drobnoustrojów w żywności.

Ze względu na swój skład chemiczny żywność dysponuje idealnymi warunkami do wzrostu i namnażania różnych mikroorganizmów. Na szybkość ich rozwoju w surowcach spożywczych mają wpływ zarówno czynniki fizyczne, jak i chemiczne, w tym głównie skład chemiczny, ale także temperatura i wilgotność otoczenia. Mikrobiologiczne psucie się żywności to proces polegający na rozkładzie podstawowych składników organicznych żywności do prostych związków nadających produktom nieprzyjemny wygląd, smak i zapach.

6.1. Mikroflora surowców i produktów spożywczych

Produkty, które trafiają na półki sklepowe, muszą być przebadane pod kątem obecności drobnoustrojów, głównie chorobotwórczych. Ma to na celu zapobieganie zakażeniom i zatruciom pokarmowym. W tabeli 3 przedstawiono najczęstsze mikrobiologiczne czynniki etiologiczne zakażeń i zatruc pokarmowych.

Liczba drobnoustrojów w żywności jest zmienna, bo żywność pod względem mikrobiologicznym jest środowiskiem dynamicznym, dlatego w odniesieniu do produktów spożywczych obserwuje się:

- dynamizm ujemny liczby drobnoustrojów, np. w mrożonkach – w czasie składowania liczba komórek zmniejsza się,
- dynamizm dodatni liczby drobnoustrojów, np. owoce, świeże mięso – podczas składowania liczba komórek wzrasta.

W związku z tym głównym celem analizy mikrobiologicznej żywności jest zapewnienie bezpieczeństwa żywności i ochrona zdrowia konsumentów. Zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa wszystkie środki spożywcze, zarówno te produkowane, jak i te wprowadzane do obrotu, muszą spełniać wymagania mikrobiologiczne określone w Rozporządzeniu Komisji WE (Wspólnoty Europejskiej) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.

Tabela 3. Czynniki etiologiczne zakażeń i zatruc pokarmowych (kolejność alfabetyczna)

BAKTERIE	
GRAM-DODATNIE	GRAM-UJEMNE
<i>B. cereus</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Salmonella</i> spp.
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Shigella</i> spp.
<i>S. aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
WIRUSY	GRZYBY
adenowirusy	
astrowirusy	
enterowirusy	<i>Fusarium culmorum</i>
norowirusy	<i>F. graminearum</i>
rotawirusy	<i>Mucor</i> spp.
HAV (wirus zapalenia wątroby typu A, ang. <i>hepatitis A virus</i>)	<i>Rhizopus</i> spp.
HEV (wirus zapalenia wątroby typu E, ang. <i>hepatitis E virus</i>)	<i>Thamnidium</i> spp.
	mykotoksyny

6.2. Analiza drobnoustrojów w żywności

Przed przystąpieniem do analiz mikrobiologicznych żywności należy poznać specyfikę danego produktu (surowce wykorzystywane do jego produkcji, proces otrzymywania produktu, sposoby i warunki magazynowania). Próbkę pobierana do badań powinna być reprezentatywna dla całej partii badanego surowca/produktu, co zapewnia wiarygodność uzyskanych wyników. W przypadku badań ilościowych masa lub objętość próbki powinna wynosić 10 g lub 10 cm³. Produkty płynne i sypkie przed pobraniem próbki należy dokładnie wymieszać, aby zapewnić jednorodność materiału. Pobrana próbka zostaje zawieszona lub umieszczona w 90 cm³ (ml) jałowego płynu do rozcieńczeń. Najczęściej stosowanym medium jest 0,85% (w/v) wodny roztwór NaCl, który może być wzbogacony o 0,1% pepton kazeinowy, bufor fosforanowy lub cytrynianowy. Alternatywnie stosowany jest również płyn Ringera – izotoniczny roztwór zawierający wodę oraz sole mineralne: chlorki sodu, potasu, wapnia i dwuwęglan sodu. Następnie próbkę poddaje się homogenizacji w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny drobnoustrojów.

W przypadku spodziewanej wysokiej liczebności drobnoustrojów ($\geq 10^6$ jtk/g lub jtk/ml) konieczne jest wykonanie szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń w postępie geometrycznym. Dopiero z odpowiednich rozcieńczeń wykonuje się posiewy na podłoża mikrobiologiczne, co umożliwia dokładną ocenę liczby jednostek tworzących kolonie (jtk) w badanym materiale.

Do oznaczeń mikrobiologicznych żywności należy:

- oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych (optimum wzrostu w 37°C) i psychrofilnych (optimum wzrostu w 4°C), liczby drożdży i pleśni,
- wykrywanie obecności czynników patogennych, głównie gronkowców chorobotwórczych, beztlenowych bakterii przetrwalnikujących *B. cereus*, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w tym *Salmonella* spp., *E. coli*,
- wykrywanie obecności / oznaczanie liczby *L. monocytogenes*,
- wykrywanie toksyn bakteryjnych (botulinowej, gronkowcowej) oraz mykotoksyn.

W tabeli 4 przedstawiono mikroflorę wybranych produktów spożywczych.

Klasyczne metody analizy mikrobiologicznej żywności obejmują posiew produktu na podłoża mikrobiologiczne, izolację czystych kultur, a następnie charakterystykę morfologiczną, fizjologiczną, biochemiczną i serologiczną wyizolowanych drobnoustrojów. Wśród metod oznaczania liczby komórek drobnoustrojów wyróżnia się metody wskaźnikowe, bezpośrednie liczenie (mikroskopowanie) oraz pośrednie liczenie (metody hodowlane), czyli metodę płytkową oraz określenie najbardziej prawdopodobnej liczby drobnoustrojów (NPL). W **metodzie płytkowej** oblicza się ilość kolonii drobnoustrojów po hodowli na odpowiednim podłożu mikrobiologicznym. Polega ona na wysiewie odpowiednio rozcieńczonej zawiesiny komórek mikroorganizmów na podłożu stałe, następnie inkubacji i policzeniu wyrosłych kolonii. Zakłada się, że z każdej komórki wyrośnie jedna kolonia. **Metoda NPL** obejmuje hodowlę drobnoustrojów w pożywce płynnej, która ulega zmianom pod wpływem ich wzrostu, a odczytu dokonuje się na podstawie specjalnie opracowanych tablic.

Tabela 4. Mikroflora wybranych produktów spożywczych

PRODUKT SPOŻYWCZY	MIKROFLORA	
	SUROWCA (PIERWOTNA)	CHOROBOTWÓRCZA
MIĘSO	rodzina Enterobacteriaceae, bakterie z rodzaju: <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i>	<i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> (eneterotoksyna gronkowcowa), <i>C. botulinum</i> (toksyna botulinowa), <i>C. perfringens</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.
CIASTKO Z KREMEM	rotawirusy, bakterie z rodzaju: <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , bakterie grupy coli, <i>Candida</i> spp., <i>A. flavus</i> (aflatoksyna)
KIEŁKI	<i>B. subtilis</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , archeony, <i>A. flavus</i> (aflatoksyna), <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.

7. Analiza mikrobiologiczna produktów spożywczych. Część II

W ramach tego rozdziału omówiono źródła mikrobiologicznego zanieczyszczenia żywności oraz metody służące utrwalaniu żywności.

7.1. Źródła mikrobiologicznego zanieczyszczenia żywności

Aby zrozumieć przyczyny mikrobiologicznego zanieczyszczenia żywności oraz by zapobiegać ich skutkom, niezbędna jest przede wszystkim wiedza z zakresu fizjologii drobnoustrojów, środowisk ich bytowania oraz optymalnych warunków do wzrostu i rozwoju. Źródłami mikrobiologicznego zanieczyszczenia żywności są:

- mikroflora pierwotna produktów zwierzęcych i roślinnych (mięso, ryby, mleko, jaja, warzywa, owoce),
- mikroflora surowców dodatkowych (sól, cukier, przyprawy),
- człowiek (niewłaściwe procesy technologiczne i higiena personelu),
- mikroflora środowiska (powietrze, woda i gleba).

Mikroorganizmy w powietrzu występują w postaci bioaerozolu, będącego pewnego rodzaju układem koloidalnym, tworzonym przez komórki wegetatywne bakterii, przetrwalniki, strzępki, zarodniki pleśni, komórki drożdży, wirusy, toksyny, pyłki roślin, cząsteczki wody, substancje organiczne, nasiona oraz kurz, zawieszone w powietrzu. Bioaerol może przenosić się drogą inhalacyjną (poprzez kaszel, mówienie, kichanie), prądami konwekcyjnymi (ruch) oraz systemami klimatyzacyjno-wentylacyjnymi. Najlepiej przystosowane do przebywania w powietrzu są:

- pleśnie (w powietrzu jest ich najwięcej), gdyż wytwarzają zarodniki i barwniki ochronne,
- bakterie Gram-dodatnie (posiadają grubszą ścianę komórkową niż Gram-ujemne),
- bakterie posiadające barwniki ochronne (np. *Micrococcus* spp. – żółty barwnik).

ZAPAMIĘTAJ!

Drobnoustroje w powietrzu nie namnażają się, a jedynie są przenoszone, co wynika ze szkodliwego działania promieniowania UV oraz często niskiej wilgotności.

O przydatności wody do spożycia decyduje stopień zanieczyszczenia jej kałem. Do wskaźników zanieczyszczenia fekalnego wody należą następujące bakterie bytujące w przewodzie pokarmowym:

- bakterie grupy coli – *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp.,
- paciorkowce kałowe, głównie *E. faecalis* i *E. faecium*,
- *C. perfringens*.

Stwierdzenie obecności bakterii grupy coli i paciorkowców kałowych w badanej próbce wody świadczy o świeżym zanieczyszczeniu wody kałem (drobnoustroje te nie przetrwalnikują), natomiast wykrycie *C. perfringens* (wytwarzającego przetrwalniki) wskazuje na zanieczyszczenie długotrwałe (Caruso i in., 2017).

7.2. Utrwalanie żywności

Właściwe utrwalenie żywności umożliwia jej dłuższe przechowywanie oraz transport na duże odległości, co ułatwia ciągłe zaopatrzenie i wyżywienie ludności, niezależnie od rejonu i sezonowości danych produktów. Istnieje kilka rodzajów metod utrwalania żywności, jednak zasadniczy podział wyróżnia metody: fizyczne, biologiczne oraz chemiczne (Molenda, 2010).

Metody fizyczne są oparte na wykorzystaniu niskich lub wysokich temperatur, wysokiego ciśnienia, modyfikacji atmosfery, promieniowania UV lub ultradźwięków. Wśród metod wykorzystujących wysokie temperatury wyróżnia się przede wszystkim: pasteryzację, tyndalizację, sterylizację (w tym sterylizację błyskawiczną ang. *ultra high temperature*, UHT), natomiast utrwalanie żywności niskimi temperaturami obejmuje chłodzenie i mrożenie (Amit i in., 2017).

Metody biologiczne utrwalania żywności wykorzystują m.in. proces fermentacji mlekowej, która zachodzi na skutek obecności beztlenowych bakterii mlekowych i polega na rozkładzie cukrów

prosty do kwasu mlekowego, który hamuje rozwój bakterii gnilnych. Metody biologiczne obejmują również zastosowanie enzymów (np. lizozymu), niszczących ścianę komórkową drobnoustrojów lub bakteriocyn (np. nizinyny) – substancji aktywnych przeciwdrobnoustrojowo, które przedłużają okres przydatności produktów do spożycia. Lizozym wykorzystywany jest przy produkcji serów dojrzewających jako składnik redukujący liczbę bakterii kwasu masłowego, szczególnie *Clostridium tyrobutyricum*, odpowiedzialnych za tzw. późne wzdęcia serów, oraz w monitorowaniu obecności bakterii kwasu mlekowego w piwie, nie wpływa przy tym na jego właściwości sensoryczne i stabilność piany (Nowicka i in., 2014; Tavman i in., 2019).

Natomiast chemiczne metody utrwalania żywności stosuje się, gdy nie można wykorzystać metod fizycznych lub biologicznych, i polegają one na dodaniu małej ilości substancji zapobiegającej zmianom mikrobiologicznym i chemicznym do produktu spożywczego. Do takich substancji zalicza się konserwanty, przeciwutleniacze, kwasy organiczne i nieorganiczne. Stężenia związków chemicznych wprowadzanych do żywności są precyzyjnie określone w aktach prawnych, dlatego nie powinny oddziaływać negatywnie na zdrowie konsumentów. Wśród metod chemicznych wyróżnia się: wędzenie, peklowanie, marynowanie, solenie oraz dodawanie konserwantów. Podczas wędzenia mięso i jego przetwory poddaje się działaniu ciepła i związków chemicznych (fenoli i aldehydów) zawartych w dymie powstałym podczas spalania drewna, co wpływa bakterio- i grzybobójczo. Natomiast do peklowania wykorzystuje się tzw. mieszanki peklujące zawierające sól, cukier, azotan (III) sodu, azotan (V) sodu, niekiedy kwas askorbinowy. Dodatek azotanu (III) sodu i azotanu (V) sodu poprawia barwę mięsa i jego zapach poprzez ograniczenie utleniania tłuszczów, jednak spożywane w nadmiernej ilości w organizmie człowieka mogą przekształcić się w nitrozaminy o działaniu rakotwórczym. Marynowanie najczęściej stosuje się do przetworów warzywnych (sałatek, surówek) oraz grzybów przy zastosowaniu kwasu octowego (obecnego w popularnym occie kuchennym) w stężeniu 0,5–0,8% (marynata łagodna) lub 3% (ostra). Dodatek konserwantów (oznaczonych symbolem E i numerami od 200 do 299) ma za zadanie zmniejszyć lub całkowicie zahamować enzymatyczne i mikrobiologiczne procesy zachodzące w żywności i w tym celu najczęściej stosuje się: sorbinian potasu (E202), kwas benzoesowy (E210) i jego sól – benzoesan sodu (E211), kwas mrówkowy (E236) oraz kwas propionowy (E280) (Amit i in., 2017; Tavman i in., 2019).

8. Mikroorganizmy w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Eliminacja drobnoustrojów

W tym rozdziale zostaną omówione enzymy drobnoustrojów wykorzystywane w przemyśle oraz procesy eliminujące drobnoustroje ze środowiska produkcyjnego.

8.1. Mikrobiologia przemysłowa

Grzyby to organizmy heterotroficzne, u których wchłanianie rozpuszczonych związków organicznych zachodzi bezpośrednio przez ścianę komórkową. W przypadku cząsteczek o większych rozmiarach, jak np. celuloza czy lignina, wymagane jest rozłożenie ich do mniejszych cząsteczek. W tym celu strzępki grzybów wydzielają do środowiska enzymy celulolityczne i ligninolityczne, które rozkładają te polimery na mniejsze fragmenty (Długoński, 2020). Enzymy to białka lub glikoproteiny katalizujące (przyspieszające) przemiany chemiczne zachodzące w organizmie. Z uwagi na szereg zalet tych biokatalizatorów, wśród których wymienić można m.in. specyficzność reakcji czy łatwość wykorzystanie metod inżynierii genetycznej do ich modyfikacji i uzyskania określonych właściwości, stosuje się je na szeroką skalę w wielu procesach przemysłowych, medycynie i ochronie środowiska. Obecne tendencje w produkcji enzymów wskazują na zastępowanie tych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego przez rekombinowane białka, wytwarzane przez drobnoustroje w warunkach nadprodukcji (Kües, 2015; Chapman i in., 2018).

W przemyśle najczęściej stosuje się wytwarzane przez bakterie i grzyby:

- Enzymy amylolityczne, jak np. α -amylaza, β -amylaza, glukoamylaza, pullulanaza, izoamylaza, które rozkładają skrobię i inne polisacharydy na cukry prostsze. Są produkowane m.in. przez *Aspergillus oryzae* oraz *Bacillus* spp. i wykorzystywane są:
 - w produkcji glukozy i syropów dla przemysłu cukierniczego i owocowo-warzywnego,
 - jako środek słodzący w przemyśle piekarniczym i piwowarskim,
 - w cukiernictwie (odzyskiwanie cukru z odpadów cukierniczych),
 - w gorzelnictwie (scukrzanie skrobi ziemniaczanej lub zbożowej),
 - w produkcji środków zagęszczających, dodatków do sosów, budyni, składników odżywek dla dzieci,
 - w przemyśle kosmetycznym jako dodatek do środków piorących.
- Enzymy cytolityczne, np. egzo β -(1,4)-glukanaza, endo β -(1,4)-glukanaza, β -glukozydaza, które rozkładają celulozę i hemicelulozę na cukry prostsze. Wytwarzane są przez grzyby z rodzaju: *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., bakterie z rodzaju: *Clostridium*, *Cellulomonas*, promieniowce: *Streptomyces* spp., *Actinomyces* spp. Znalazły zastosowanie w:
 - usuwaniu zmętnień spowodowanych obecnością błonnika w sokach owoców cytrusowych,
 - hydrolizowaniu włókna w konserwowanych lub zamrażanych warzywach (fasola, szpinak),
 - rozluźnianiu tkanek roślinnych przed poddaniem ich ekstrakcji lub tłoczeniu.
- Enzymy proteolityczne, np. pepsyna, chymozyna (podpuszczka), liozozym, które hydrolizują wiązania peptydowe. Wśród producentów proteaz można wskazać grzyby *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *Rhizopus* spp. oraz bakterie *Pseudomonas* spp. Preparaty proteolityczne wykorzystywane są m.in.:
 - w koagulacji białek mleka podczas wyrobu serów,
 - w celu przyspieszenia dojrzewania solonych i marynowanych śledzi,
 - do ulepszenia konsystencji, wartości biologicznej, cech organoleptycznych mięsa,
 - do poprawy stabilizacji i klarowności piwa,
 - w celu polepszenia pulchności i konsystencji ciasta,
 - jako składniki proszków do prania.

- Enzymy lipolityczne, np. lipaza wytwarzana przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* oraz szczepy bakterii *Pseudomonas*, odpowiada za hydrolizę tłuszczów do kwasów tłuszczowych i glicerolu. W przemyśle znalazły zastosowanie w:
 - odtwarzaniu zapachu „mlecznego”,
 - ulepszaniu cech organoleptycznych i skróceniu okresu dojrzewania serów,
 - produkcji koncentratów zapachowych z tłuszczu mlekowego mających zastosowanie przy produkcji sosów i przypraw do zup,
 - wytwarzaniu preparatów piorących (Kües, 2015).

Drożdże są organizmami tlenowymi, jednak część z nich wykazuje zdolność do wzrostu w warunkach beztlenowych, gdzie podczas fermentacji alkoholowej rozkładają związki organiczne, głównie cukry proste i złożone, do dwutlenku węgla i etanolu, z wydzieleniem energii magazynowanej w ATP (adenozyno-5'-trifosforanie), a produktem ubocznym tego procesu jest glicerol oraz wiele innych związków odpowiadających za smak i zapach napoju (Drewniak, 2018).

W przemyśle spożywczym i gorzelniczym najczęściej wykorzystuje się drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Wytwarzany w trakcie fermentacji alkoholowej CO₂ wykorzystywany jest w piekarnictwie do spulchniania ciasta. W latach 1857–1858 Ludwik Pasteur, uznawany współcześnie za „ojca mikrobiologii”, prowadził badania nad fermentacją i wyjaśnił, czym są drożdże oraz jaką rolę odgrywają w procesie przemiany cukrów w alkohol etylowy. Dodatkowo odkrycie Pasteura przyczyniło się do opracowania metody chronienia produktów spożywczych przed zepsuciem, czyli pasteryzacji, polegającej na niszczeniu większości form wegetatywnych drobnoustrojów poprzez ogrzanie produktów spożywczych (m.in. mleka, piwa, wina, soków owocowych) do temperatury od 62°C do 95°C. Grzyby są zdolne do wytwarzania nie tylko enzymów, lecz także substancji wykazujących działanie bakteriobójcze – antybiotyków, co zostało odkryte przypadkowo w 1928 r. przez Alexandra Fleminga. Zaobserwował on, że pleśń *Penicillium notatum* wytwarza substancję, która uniemożliwia rozwój kolonii bakterii gronkowca złocistego wyhodowanego wcześniej przez Fleminga. Substancję nazwał penicyliną od nazwy grzybów, jednak nie udało mu się jej samodzielnie wyodrębnić. Nastąpiło to po kilkuletniej współpracy z Howardem Walterem Florey’em oraz z Ernstem Borisem Chainem, a osiągnięcie to zostało uhonorowane w 1945 r. przyznaniem Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny (Drewniak, 2018).

8.2. Procesy prowadzące do usunięcia czynników mikrobiologicznych

Choć w wielu aspektach drobnoustroje i/lub ich metabolity są wykorzystywane w gospodarce, to rozprzestrzenienie patogenów lub drobnoustrojów oportunistycznych ma negatywny wpływ na człowieka. Brak przestrzegania higieny produkcji czy zanieczyszczenie środowiska przetwórczego mogą doprowadzić do kontaminacji surowca, półproduktów czy gotowych produktów spożywczych czynnikami zakaźnymi. W placówkach medycznych zakażenia szerzą się krzyżowo – zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio. Zakażenie krzyżowe to proces przeniesienia drobnoustrojów, takich jak bakterie czy wirusy, z jednej osoby, powierzchni lub materiału na inny organizm lub przedmiot. Zakażenia szpitalne związane z wykonywaniem procedur medycznych stanowią poważny problem wszystkich szpitali, nawet w krajach o najwyższych standardach opieki zdrowotnej. Według definicji zakażenie szpitalne to każde zakażenie nabyte w szpitalu, rozpoznane klinicznie i potwierdzone laboratoryjnie, które ujawniło się podczas pobytu chorego w szpitalu lub po jego opuszczeniu. Najczęstszą przyczyną zakażeń szpitalnych są drobnoustroje pochodzące ze środowiska szpitalnego, a ich źródłem są w dużej mierze pracownicy, chorzy, a także odwiedzający. Podstawą zapobiegania transmisji czynników mikrobiologicznych w środowisku przemysłowym oraz zakażeń w placówkach medycznych są procesy dekontaminacji prowadzące do usunięcia lub zniszczenia drobnoustrojów (Bober-Gheek, 2006). W ograniczeniu szerzenia się drobnoustrojów istotną rolę odgrywają:

- sanityzacja – usuwanie widocznych zabrudzeń i zanieczyszczeń, a wraz z nimi także większości drobnoustrojów; powinna poprzedzać dezynfekcję i sterylizację,
- dezynfekcja (odkażanie) – usuwanie drobnoustrojów ze środowiska i powierzchni przedmiotów, podczas którego dochodzi do niszczenia form wegetatywnych drobnoustrojów poprzez działanie na ich strukturę lub metabolizm,

- sterylizacja (wyjaławianie) – postępowanie mające na celu niszczenie wszystkich form drobnoustrojów (form wegetatywnych i przetrwalników) znajdujących się na i w przedmiotach lub płynach,
- antyseptyka – postępowanie prowadzące do usuwania drobnoustrojów ze skóry, błon śluzowych, uszkodzonych tkanek,
- aseptyka – postępowanie mające na celu dążenie do jałowości pomieszczeń, narzędzi, materiałów opatrunkowych, leków, a tym samym zapobiegające zakażeniu.

Poza wskazanymi procesami dekontaminacji podstawowym elementem ochrony pacjentów przed zakażeniami szpitalnymi jest stosowanie rygorystycznych procedur higienicznych, takich jak mycie rąk przez personel oraz odwiedzających. Higieniczne mycie rąk trwa około 20–30 sekund i prowadzi się je z użyciem mydła i wody, co pozwala usunąć większość mikroorganizmów z powierzchni dłoni. Natomiast dezynfekcja dłoni to pozbycie się drobnoustrojów bez użycia wody, ale z udziałem środka dezynfekującego. Noszenie maseczek ochronnych oraz ochraniaczy na obuwiu znacząco ogranicza ryzyko przenoszenia patogenów między pomieszczeniami, zwłaszcza w obszarach o podwyższonym ryzyku epidemiologicznym. Zachowanie zasad aseptyki nie tylko zabezpiecza osoby hospitalizowane, ale także tworzy środowisko sprzyjające bezpiecznemu wykonywaniu procedur medycznych.

ZAPAMIĘTAJ!

Przestrzeganie standardów higieny powinno być konsekwentnie egzekwowane i systematycznie kontrolowane, ponieważ stanowi filar profilaktyki zakażeń w placówce.

W tabeli 5 przedstawiono podział metod dezynfekcji i sterylizacji wraz z przykładami czynników lub mechanizmów w nich stosowanych. Opis wymienionych metod umieszczono pod tabelą.

Tabela 5. Wykaz metod dezynfekcji i sterylizacji wraz ze środkami w nich stosowanymi

METODY DEZYNFEKCJI		
fizyczne	chemiczne	mechaniczne
temperatura: pasteryzacja promieniowanie: UV, jonizujące	alkohole aldehydy związki chloru związki fenolu związki utleniające	filtracja
METODY STERYLIZACJI		
niskotemperaturowe	wysokotemperaturowe	
tlenek etylenu (TE) formaldehyd w formie gazowej plazma gazowa kwas nadoctowy ozon	wyżarzanie i opalanie para wodna w nadciśnieniu bieżąca para wodna (tyndalizacja) suche gorące powietrze	

8.2.1. Chemiczne metody dezynfekcji

Płynne środki dezynfekcyjne niszczą błonę lipidową, co zaburza uporządkowanie białek i lipidów, które budują osłony mikroorganizmów, powodują także zaburzenia enzymatyczne, koagulację cytoplazmy i/ lub niszczenie materiału genetycznego.

Chemiczne środki do dezynfekcji różnią się aktywnością biologiczną i mechanizmem działania. Aktywność biologiczna zależy od rodzaju związku chemicznego i jego stężenia, gatunku mikroorganizmów, stanu fizjologicznego i liczebności populacji, czynników środowiskowych (temperatury,

kwasowości podłoża) i obecności substancji organicznych w otoczeniu. W zależności od rodzaju czynników chemicznych, a także od ich stężenia, efektem może być zabicie mikroorganizmów (działanie bakteriobójcze) lub jedynie zahamowanie ich wzrostu i rozwoju (działanie bakteriostatyczne).

Środki dezynfekcyjne powinny wykazywać następujące cechy:

- skuteczność,
- szerokie spektrum działania na drobnoustroje w małym stężeniu, w krótkim czasie i w temperaturze otoczenia,
- nietoksyczność dla ludzi zarówno w trakcie ich stosowania, jak i po dezynfekcji,
- możliwość spłukania wodą,
- brak nieprzyjemnego zapachu.

Do dezynfekcji stosuje się preparaty na bazie alkoholi, aldehydów, związków fenolowych, związków chloru lub jodu, związków nadtlenowych czy związków amoniowych. Ponadto, wykorzystuje się roztwory kwasów i zasad, chlorheksydynę czy sole metali ciężkich (Bober-Gheek, 2006).

8.2.2. Metody fizyczne dezynfekcji

Zastosowanie wysokich temperatur:

- wyżarzanie i opalanie – metalowe ezy wyżarza się do czerwoności w płomieniu palnika, opala się wyloty szklanych kolb czy bagietki; czynność tę wykonuje się przed każdym użyciem i po nim,
- gotowanie (dekoktacja) – umieszczenie przedmiotów (np. szkiełek podstawowych, sprzętu medycznego) w wodzie destylowanej o temp. 100°C i utrzymywanie tej temperatury przez 30 min, następnie przechowywanie w 95% etanolu (to przykład dezynfekcji mieszanej fizyczno-chemicznej),
- pasteryzacja – jednorazowe, krótkotrwałe ogrzanie cieczy do temperatury < 100°C (60–80°C) przez 30 minut, a następnie oziębienie do temperatury pokojowej – giną wegetatywne formy bakterii; procedura ma zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym – produkty wrażliwe na wysokie temperatury (mleko, śmietanki, moszcz, soki, piwo i inne) wyjaławia się poprzez wykorzystanie sterylizacji w bardzo wysokiej temperaturze (ang. *ultra high temperature*, UHT), która polega na błyskawicznym, trwającym 2–10 sekund, podgrzaniu produktu spożywczego do temperatury ponad 100°C (135–150°C w przypadku mleka); dodatkowo wyróżnia się modyfikacje tego procesu, np. pasteryzację długotrwałą (niską; ang. *low temperature long-time*, LTLT): temperatura 62–65°C / 20–30 minut; krótkotrwałą (wysoką; ang. *high temperature short-time*, HTST): temperatura 72°C / 15 sekund; momentalną (wysoką; ang. *very high temperature*, VHT): temperatura 85–90°C / 1–2 s.

Promieniowanie: promieniowanie UV jest wykorzystywane do niszczenia mikroorganizmów występujących w powietrzu i na odkrytych powierzchniach zamkniętych, np. blatach stołów laboratoryjnych i powietrza w laboratoriach, boksów bakteriologicznych i komórkowych, sal operacyjnych, linii technologicznych czy magazynów. Promieniowanie jonizujące wykorzystuje się natomiast do usuwania mikroorganizmów ze sprzętu medycznego, materiałów implantacyjnych i opatrunkowych. Promieniowanie uszkadza błony komórkowe, zakłóca replikację drobnoustrojów. W zależności od dawki, odległości od lampy oraz czasu działania promieniowania obserwuje się efekt mutageny lub letalny (bójczy).

8.2.3. Metody mechaniczne dezynfekcji

Filtrowanie – najczęściej używane są filtry membranowe o porach od 0,20 do 0,40 µm średnicy. Ponieważ pory są mniejsze od wymiarów bakterii, odfiltrowane drobnoustroje osadzają się na filtrze. Sam proces mechanicznej dezynfekcji nie gwarantuje jałowości filtratu. Aby uniknąć wtórnego skażenia, konieczne jest przeprowadzenie filtracji w warunkach aseptycznych, z użyciem jałowego sprzętu.

8.2.4. Metody sterylizacji wysokotemperaturowej

Gorące i suche powietrze – w sterylizatorach utrzymywana jest temperatura 160–170°C przez 60–90 minut. Przedmioty w ten sposób jałowione muszą zostać przed sterylizacją zabezpieczone przed powtórny zakażeniem – w tym celu pakuje się je w papier, folię lub opakowania papierowo-foliowe, probówki i kolby zamyka się korkami, pipety umieszcza się w metalowych puszkach lub tubusach. Ten sposób działania służy również do sterylizacji materiałów wrażliwych na wilgoć lub nieprzepuszczalnych dla wilgotnego powietrza, np. substancji oleistych, proszku.

Tyndalizacja – trzykrotne ogrzanie cieczy do temperatury 100°C w odstępach 24-godzinnych. Proces ten przeprowadzany jest w aparacie Kocha. W pierwszej fazie (ogrzewanie w 100°C przez 30 minut) giną formy wegetatywne. Okres przerwy po pierwszym etapie pozwala na wykiełkowanie form przetrwalnikowych, które nie uległy zabiciu. Drugie ogrzanie zabija formy wegetatywne, które rozwinęły się z form przetrwalnikowych, a trzecie upewnia nas o zabiciu wszystkich drobnoustrojów. Tyndalizacja służy wyjaławianiu podłoża mikrobiologicznych zawierających składniki wrażliwe na działanie temperatury powyżej 100 °C.

Gorąca para wodna pod ciśnieniem – jałowienie przyborów medycznych zachodzi w autoklawie pod wpływem pary wodnej osiągającej pod ciśnieniem 1 atm. temperaturę 121°C w czasie 15–20 min lub w nadciśnieniu 2 atm. W temperaturze 134°C w czasie 3,5–7 min w tzw. cyklu *flash*. Autoklawowaniu w temperaturze 121°C przez 20–30 min poddawane są również podłoża mikrobiologiczne, natomiast dla pożywek zawierających cukry, żelatynę i inne składniki termolabilne stosuje się temperaturę 117°C (Różańska 2020; Sokół-Leszczyńska i in., 2012).

8.2.5. Metody sterylizacji niskotemperaturowej

Do sterylizacji materiałów wrażliwych na temperaturę i wilgoć służy sterylizacja niskotemperaturowa. Są to metody, w których wykorzystuje się różne czynniki chemiczne i fizyczne (Bober-Gheek, 2006):

- tlenek etylenu (TE) – niszczy drobnoustroje w wyniku alkilacji białek, DNA, RNA; wykorzystuje się czysty TE lub w mieszaninie z hydroksyfreonem oraz dwutlenkiem węgla; służy do wyjaławiania drobnego sprzętu medycznego wykonanego z materiałów termolabilnych;
- formaldehyd w formie gazowej – stosowany w zakresie temperatur 48–70°C do sterylizacji endoskopów sztywnych, sond ultradźwiękowych; nie jest zalecany do materiałów silnie pochłaniających formaldehyd wykonanych z gumy, celulozy i poliuretanu;
- plazma gazowa – to zjonizowany gaz wytwarzany w warunkach próżni pod wpływem pola elektromagnetycznego, niszczy drobnoustroje poprzez uszkodzenie DNA, RNA, enzymów, fosfolipidów; służy do sterylizacji instrumentów z otwartym, długim, wąskim światłem (narzędzia z kanałem otwartym na obydwu końcach, np. kamery, zgłębniki);
- kwas nadoctowy – mieszanina kwasu nadoctowego, octowego i nadtlenu wodoru, działanie bójcze oparte jest na utlenianiu białek; substancja jest wykorzystywana do sterylizacji sprzętu i narzędzi w odpowiednich kasetach poprzez ich całkowite zanurzenie w roztworze;
- ozon – uszkodza błonę komórkową bakterii oraz otoczkę białkową i łańcuchy peptydowe wirusów i tym samym zaburza możliwość ich namnażania się; jako gaz dociera do przestrzeni trudnych do zdezynfekowania inną metodą, nie można go jednak stosować podczas przebywania ludzi w ozonowanym pomieszczeniu (Różańska, 2020).

9. Nowoczesne techniki wykorzystywane w diagnostyce mikrobiologicznej.

Diagnostyka wirusologiczna

Ten rozdział poświęcony jest nieopisanym wcześniej metodom stosowanym w diagnostyce mikrobiologicznej.

9.1. Narzędzia biologii molekularnej

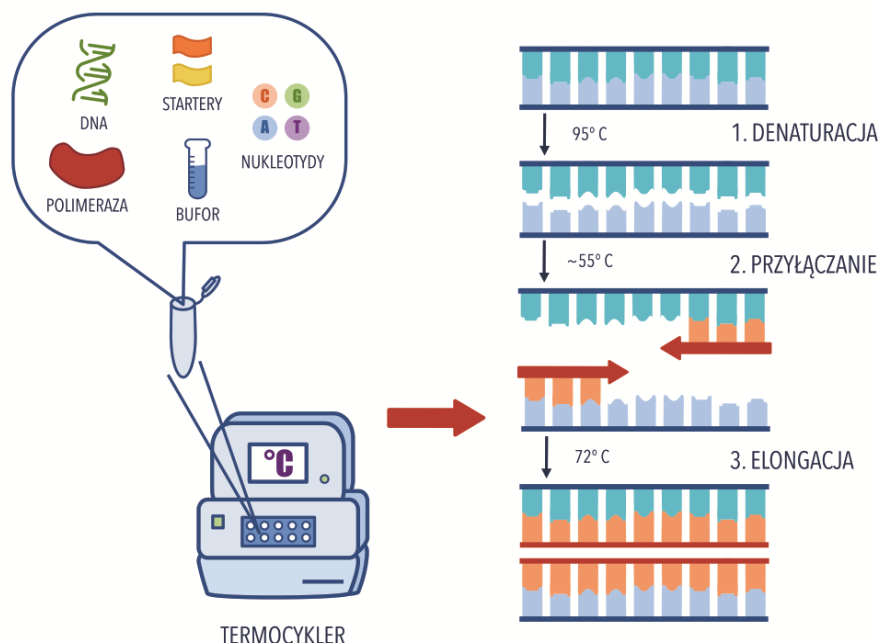
Lepsze poznanie struktur czynników mikrobiologicznych pozwoliło opracować techniki, które umożliwiają detekcję ich unikatowych elementów na poziomie molekularnym. Metody te obejmują narzędzia biologii molekularnej, które pozwalają zidentyfikować substancje wielkocząsteczkowe, np. kwasy nukleinowe czy białka. Wśród takich metod wyróżniamy metody analizy zarówno genomu, transkryptomu, jak i proteomu, które polegają na izolacji i późniejszym oczyszczaniu interesujących nas elementów oraz ich ocenie ilościowej. Genom to kompletna informacja genetyczna organizmu zawarta w jego DNA, natomiast transkryptom obejmuje wszystkie cząsteczki RNA powstające w wyniku transkrypcji genów z DNA. Proteom to zbiór białek produkowanych w komórce na podstawie informacji genetycznej i aktywności transkryptomu. Ponadto wyniki badań „omicznych” odpowiadają na pytania dotyczące mechanizmów regulujących procesy życiowe mikroorganizmu czy interakcji pomiędzy patogenami a komórkami gospodarza.

Powszechną techniką laboratoryjną, będącą przykładem takiego narzędzia, jest reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*), która polega na wielokrotnym powielaniu (zwykle w 30–40 cyklach) specyficznego fragmentu DNA, np. genów kodujących białka danego mikroorganizmu, za pomocą enzymu polimerazy (ryc. 17). Następnie, w celu uwidocznienia namnożonego fragmentu DNA, stosuje się specjalne barwniki molekularne. PCR, dzięki powielaniu określonych fragmentów DNA, jest metodą ultraczułą. Obecnie istnieje wiele modyfikacji metody PCR, a jedną z nich jest PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). Metoda ta jest ilościowa i pozwala na określenie dokładnej liczby kopii danego fragmentu DNA w badanym materiale biologicznym (Kralik i Ricchi, 2017).

9.2. Diagnostyka/badanie mikrobioty jelitowej

Obecnie diagnostyka mikrobioty jelitowej obejmuje wykonanie posiewów mikrobiologicznych oraz, w przypadku bakterii niehodowlanych, szczegółowej analizy z wykorzystaniem technik biologii molekularnej z próbki kału (analiza sekwencji konserwatywnych regionów genu 16S rRNA (rybosomalnego RNA) czy metoda sekwencjonowania całogenomowego) (Panasiuk, 2019).

W ramach oceny bakterii hodowlanych wykonuje się m.in. jakościowe i ilościowe badanie mikrobiologiczne kału wykonywane metodą posiewów mikrobiologicznych. Przykładem takiego badania jest KyberKompakt służący do ilościowej i jakościowej diagnostyki bakteriologicznej i mykologicznej mikrobioty jelitowej. W badaniu tym posiewy mikrobiologiczne są wykonywane z szeregu rozcieńczeń próbki kału. Przed wykonaniem posiewów oceniany jest wygląd, konsystencja, ale także pH kału. Diagnostyka bakteriologiczna z wykorzystaniem tego testu obejmuje identyfikację oraz ocenę ilościową ogólnej liczby bakterii, jak i liczebności bakterii poszczególnych rodzajów/gatunków np. *E. coli*, *E. coli* BioVare, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., bakterii proteolitycznych z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp. wytwarzających nadtlenek wodoru czy *Clostridium* spp. Liczebność bakterii jest wyrażana w jednostkach tworzących kolonię (ang. *colony forming units*; CFUs) na 1 gram kału (CFU/g). W badaniu mykologicznym wykonuje się identyfikację oraz ocenę ilościową (wyrażoną w CFU/g) grzybów drożdżopodobnych oraz pleśniowych w próbce kału (Gałęcka i in., 2017).



Rycina 17. Etapy reakcji PCR (rys. D. Szmajda-Krygier)

9.3. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa to zaawansowana technika analityczna umożliwiająca jednoczesną ocenę wielu parametrów fizycznych i biochemicznych na poziomie pojedynczych komórek zawieszonych w roztworze. Przed analizą komórki są inkubowane z przeciwciałami monoklonalnymi swoiście rozpoznającymi wybrane antygeny powierzchniowe lub wewnątrzkomórkowe. Przeciwciała te są sprzężone (skoniugowane) z fluorochromami – barwnikami fluorescencyjnymi, co umożliwia detekcję sygnału pochodzącego z docelowych struktur.

Podczas przepływu próbki przez układ hydrodynamicznego ogniskowania pojedyncze komórki przechodzą przez wiązkę lasera w komorze pomiarowej. Emisja światła fluorescencyjnego, wzbudzana przez laser, jest rejestrowana przez układ detektorów optycznych, co umożliwia precyzyjną analizę ekspresji wybranych antygenów. Równocześnie mierzone są również parametry rozpraszania światła, które odzwierciedlają wielkość i ziarnistość komórek, a to pozwala na ich fenotypową i morfologiczną charakterystykę.

Niewątpliwą zaletą metody jest możliwość separacji komórek i detekcji ich ściśle określonych elementów. W diagnostyce chorób zakaźnych jest wykorzystuje się ją m.in. do określania statusu immunologicznego osób zakażonych wirusem HIV poprzez monitoring liczby i odsetka limfocytów w krwi. Ponadto może być przydatna do różnicowania gatunków drobnoustrojów poprzez detekcję ich unikatowych antygenów (Alvarez-Barrientos i in., 2000; Lewandowska Ronnegrem, 2018).

9.4. Szybkie testy diagnostyczne

Szybkie testy diagnostyczne, nazywane też „przyłóżkowymi”, są świetnym rozwiązaniem we wstępnej diagnostyce zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Na podstawie prostych testów kasetowych, które wykorzystują metody immunochromatograficzne lub biochemiczne, można zdiagnozować pacjenta pod kątem obecności w jego organizmie m.in. charakterystycznych białek (antygenów) patogenu. W sytuacji braku możliwości szybkiego transportu materiału do laboratorium mikrobiologicznego lub konieczności wstępnej kwalifikacji zakażenia u pacjenta takie rozwiązanie pozwala na weryfikację infekcji. Należy jednak pamiętać, że wspomniane testy mają niższą czułość i/lub swoistość diagnostyczną, stąd w interpretacji wyników należy zachować ostrożność.

ZAPAMIĘTAJ!

Szybkie testy diagnostyczne nie zastępują pełnej diagnostyki mikrobiologicznej!

9.5. Diagnostyka wirusologiczna

W związku z tym, że wirusy to patogeny wewnątrzkomórkowe, do ich namnażania w warunkach laboratoryjnych wykorzystuje się hodowle komórkowe pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego, pozyskiwane bezpośrednio z pobranej tkanki (pierwotne) lub stanowiąc ustabilizowane linie komórkowe o charakterze nowotworowym, które mogą być poddawane pasażowaniu bez ograniczeń. W kontekście diagnostyki wirusologicznej hodowle komórkowe cechują się wysoką czułością z uwagi na możliwość identyfikacji nawet pojedynczego wirionu czy wielu typów wirusów w próbce. Metody te są wciąż stosowane, jednak w dużej mierze w badaniach naukowych i w rutynowej diagnostyce posługiwano się nimi przed opracowaniem technik biologii molekularnej (Goździcka-Józefiak, 2022; Wróblewska i Dzieciatkowski, 2017).

Wśród metod diagnostycznych zakażeń wirusowych w materiałach klinicznych pobranych od pacjenta wyróżnia się bezpośrednio wykrywanie białek (antygenów, np. powierzchniowych otoczki) lub kwasu nukleinowego wirusa oraz pośrednie wykrycie i pomiar stężenia specyficznych przeciwciał odpornościowych skierowanych przeciw cząsteczkom wirusa (tabela 6).

ZAPAMIĘTAJ!

Testy diagnostyczne podlegają walidacji zarówno laboratoryjnej, jak i klinicznej – wymagają precyzyjnych kontroli jakości, które mają potwierdzić, że są przeprowadzane zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną.

Tabela 6. Przykłady elementów diagnostyki laboratoryjnej wybranych zakażeń wirusowych.

WIRUS	ANTYGENY	PRZECIWCIAŁA	KWAS NUKLEINOWY
WZW B	antygen powierzchniowy (HbS) antygen wczesny (HbE)	przeciwciała HBc do antygenu rdzeniowego HBV przeciwciała HBs do antygenu powierzchniowego HBV przeciwciała HBe do antygenu wydzielniczego HBV	DNA HBV
WZW C	antygen rdzeniowy (HCVc)	przeciwciała do HCV	RNA HCV
mononukleozy zakaźnej		przeciwciała do antygenu kapsydowego (VCA) EBV przeciwciała do antygenu wczesnego (EA) EBV przeciwciała do antygenu jądrowego (EBNA) EBV	EBV DNA
HIV	antygen p24	przeciwciała do HIV	HIV RNA
grypy	antygen wirusa grypy A antygen wirusa grypy B	przeciwciała do antygenu wirusa grypy A przeciwciała do antygenu wirusa grypy B	RNA

Bibliografia

- Abel-Fernández E., Martínez M.J., Galán T., Pineda F. 2023. Going over Fungal Allergy: *Alternaria alternata* and Its Allergens. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 9(5), nr art. 582. DOI: [10.3390/jof9050582](https://doi.org/10.3390/jof9050582).
- Amit S.K., Uddin M.M., Rahman R., Rezwani S.M.I., Khan M.S. 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security* 6, nr art. 51. DOI: [10.1186/s40066-017-0130-8](https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8).
- Atchade E., De Tymowski C., Grall N., Tanaka S., Montravers P. 2024. Toxic Shock Syndrome: A Literature Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 13(1), nr art. 96. DOI: [10.3390/antibiotics13010096](https://doi.org/10.3390/antibiotics13010096).
- Alvarez-Barrientos A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C., Sánchez-Pérez M. 2000. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 13(2), str. 167–195. DOI: [10.1128/CMR.13.2.167](https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.167).
- Barabasz W., Pikulicka A. 2017. Mykotoksyny – zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Część 2: Mykotoksyny zamaskowane – powstawanie, występowanie w żywności i paszach, metody identyfikacji i eliminacji mykotoksyn, prawodawstwo dotyczące mykotoksyn. *Journal of Health Study and Medicine* 3, str. 109–132.
- Baran W., Szepietowski J. 2018. Grzybyce skóry i paznokci. W: Kurnatowska A., Kurnatowski P. (red.), *Mykologia medyczna*, wyd. 1. Edra Urban & Partner, Wrocław, str. 242–249.
- Beck C., Krusche J., Elsherbini A.M.A., Du X., Peschel A. 2024. Phage susceptibility determinants of the opportunistic pathogen *Staphylococcus epidermidis*. *Current Opinion in Microbiology* 78, 102434. DOI: [10.1016/j.mib.2024.102434](https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102434).
- Beveridge T. J. 2001. Use of the gram stain in microbiology. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission* 76(3), str. 111–118.
- Bil-Lula I., Ćwiklińska A., Kamińska D., Kamińska J., Kopczyński Z., Kozłowska D., Krzywonoś-Zawadzka A., Mantur M., Mertas A., Pietruczuk M., Solnica B., Zoubek I. 2019. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej dotyczące badania upestaciowanych elementów moczu w medycznym laboratorium diagnostycznym. *Diagnostyka Laboratoryjna* 55(3), str. 145–198. DOI: [10.5604/01.3001.0013.8984](https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.8984).
- Biomed.pl [b.r.] Uromedium. Dostępne online: <https://biomed.pl/produkty/uromedium/> (dostęp: 22.09.2025).
- Biomedico [b.r.] Wymazówka z podłożem typu AMIES (bez węgla, jałowa). Dostępna online: <https://sklep.biomedico.pl/produkt/wymazowka-amies-bez-wegla-jalowa-z-wacikiem-wiskozowym-a100sztatop/> (dostęp: 22.09.2025).
- Bober-Gheek B. 2006. Postępowanie ograniczające zakażenia szpitalne/zakładowe. W: Fleischer M., Bober-Gheek B. (red.), *Podstawy pielęgniarstwa epidemiologicznego*, wyd. 2. Edra Urban & Partner, Wrocław, str. 299–428.
- Breakwell D.P., Moyes R.B., Reynolds J. 2009. Differential staining of bacteria: capsule stain. *Current protocols in microbiology* Appendix 3. DOI: [10.1002/9780471729259.mca03is15](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03is15).
- Brouwer S., Rivera-Hernandez T., Curren B.F., Harbison-Price N., De Oliveira D.M.P., Jespersen M.G., Davies M. R., Walker M.J. 2023. Pathogenesis, epidemiology and control of Group A *Streptococcus* infection. *Nature Reviews. Microbiology* 21(7), str. 431–447. DOI: [10.1038/s41579-023-00865-7](https://doi.org/10.1038/s41579-023-00865-7).
- Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria, and fungi. *Nature reviews. Microbiology* 13(10), str. 620–630. DOI: [10.1038/nrmicro3480](https://doi.org/10.1038/nrmicro3480).
- Brunzel N.A. 2016. *Diagnostyka laboratoryjna moczu i innych płynów ustrojowych*, wyd. 3. Wydawnictwo Edra Urban & Partner, Wrocław, str. 137–216.
- 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).
- 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).

- Caruso G., Delia A.S., Caruso G., Parisi S., Lagana P. 2017. Toksyny mikrobiologiczne w żywności: znaczenie *Escherichia coli*. W: Caruso G., Caruso G., Lagana P., Delia A.S., Parisi S., Barone C., Melcane L., Mazzù F. (red.), *Mikrobiologiczne zanieczyszczenia żywności*, wyd. 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 89–114.
- Chapman J., Ismail A.E., Dinu C.Z. 2018. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* 8(6), nr art. 238. DOI: [10.3390/catal8060238](https://doi.org/10.3390/catal8060238).
- Ciepiela O. 2021. *Diagnostyka laboratoryjna w pielęgniarstwie i położnictwie*, Wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str. 81-97.
- Coggins S.A., Puopolo K.M. 2024. Neonatal Group B Streptococcus Disease. *Pediatrics in Review* 45(2), str. 63–73. DOI: [10.1542/pir.2023-006154](https://doi.org/10.1542/pir.2023-006154).
- 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).
- Czyżewska U., Siemieniuk M., Bartoszewicz M., Tylicki A. 2018. Grzyby z rodzaju *Malassezia* jako oportuniści ludzi i zwierząt. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 72, str. 359–375. DOI: [10.5604/01.3001.0011.8256](https://doi.org/10.5604/01.3001.0011.8256).
- Długoński J. 2020. Mikrobiologiczna produkcja enzymów z grupy hydrolaz. W: Długoński J. (red.), *Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce. Teoria, ćwiczenia i pracownie specjalistyczne*, Wydanie 1. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, str. 220–231.
- Dominiak M., Lembicz M. 2018. Sieci grzybowe – struktura, funkcje i wykorzystanie przez człowieka. *Kosmos* 67(2), str. 313–318. DOI: [10.36921/kos.2018_2391](https://doi.org/10.36921/kos.2018_2391).
- Dominguez S.R., Doan P.N., Rivera-Chávez F. 2024. The intersection between host-pathogen interactions and metabolism during *Vibrio cholerae* infection. *Current Opinion in Microbiology* 77, nr art. 102421. DOI: [10.1016/j.mib.2023.102421](https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102421).
- Drewniak Ł. 2018. Przemysłowe zastosowania mikroorganizmów. W: Baj. J. (red.), *Mikrobiologia*, Wydanie 1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 287–296.
- El-comp.pl. [b.r.] Sterylny pojemnik na mocz poj. 120 ml. Dostępny online: <https://www.el-comp.pl/asortyment/produkt/14> (dostęp: 5.09.2025).
- El-comp.pl. [b.r.] Sterylny pojemnik na kał/mocz poj. 60 ml. Dostępny online: <https://www.el-comp.pl/asortyment/produkt/48> (dostęp: 22.09.2025).
- Ernst K. 2022. Novel Strategies to Inhibit Pertussis Toxin. *Toxins* 14(3), nr art. 187. DOI: [10.3390/toxins14030187](https://doi.org/10.3390/toxins14030187).
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Dostępne online: <https://www.eucast.org/> (dostęp: 6.03.2024).
- Ferraz Helene L.C., Klepa M. S., Hungria, M. 2022. New Insights into the Taxonomy of Bacteria in the Genomic Era and a Case Study with *Rhizobia*. *International Journal of Microbiology* 2022, nr art. 4623713. DOI: [10.1155/2022/4623713](https://doi.org/10.1155/2022/4623713).
- Gałęcka M., Basińska A.M., Bartnicka A. 2017. Kyberkompaktpro – nowoczesna diagnostyka mikroflory przewodu pokarmowego i jej znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. *Forum Zakażeń* 8(2), str. 111–116. DOI: [10.15374/FZ2017007](https://doi.org/10.15374/FZ2017007).
- Gielecińska I. 2018. Zanieczyszczenia w żywności – definicje i rodzaje zanieczyszczeń. Narodowe Centrum Edukacji Żywnościowej. Dostępne online: <https://ncez.pzh.gov.pl/abc-zywnia/zanieczyszczenia-w-zywnosci-definicje-i-rodzaje-zanieczyszczen/> (dostęp: 13.03.2024).
- Goździcka-Józefiak A. 2022. *Wirusologia*, wyd. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 318–319.
- Grenda T., Jarosz A., Sapała M., Grenda A., Patyra E., Kwiatek K. 2023. *Clostridium perfringens* – Opportunistic Foodborne Pathogen, Its Diversity and Epidemiological Significance. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 12(6), nr art. 768. DOI: [10.3390/pathogens12060768](https://doi.org/10.3390/pathogens12060768).
- Grondalska D., Kmiecik W. 2017. *Candida auris* – nowy patogen grzybiczy. *Postępy Mikrobiologii*, 56, (3), str. 282–288. DOI: [10.21307/PM-2017.56.3.282](https://doi.org/10.21307/PM-2017.56.3.282).
- Gutarowska B. 2013. Niszczenie materiałów technicznych przez drobnoustroje. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania* 18(2) str. 10–14. Dostęp online: <https://labportal.pl/niszczenie-materia-low-technicznych-przez-drobnoustroje> (dostęp: 29.04.2025).

- Guder W.G., Narayanan S., Wisser H., Zawta B. 2012. *Próbki: od pacjenta do laboratorium. Wpływ zmienności przedanalizycznej na jakość wyników badań laboratoryjnych*, wyd. 2. Wydawnictwo MedPharm, Wrocław.
- Helinski D.R. 2022. A Brief History of Plasmids. *EcoSal Plus* 10(1), nr art. eESP00282021. DOI: [10.1128/ecosalplus.esp-0028-2021](https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0028-2021).
- 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).
- Hasbun R. 2022. Progress and Challenges in Bacterial Meningitis: A Review. *JAMA* 328(21), str. 2147–2154. DOI: [10.1001/jama.2022.20521](https://doi.org/10.1001/jama.2022.20521).
- Hazlett L.D. 2005. Role of Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Keratitis. *Ocular Immunology and Inflammation* 13, nr 2–3, str. 133–138. DOI: [10.1080/09273940490912362](https://doi.org/10.1080/09273940490912362).
- Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. Portal Gov.pl. Dostępne online: <https://www.gov.pl/web/ijhars/inspekcja-jakosci-handlowej-artykułow-rolno-spozywczych> (dostęp: 13.03.2024).
- Jagielski T., Rup E., Macura A.B., Bielecki J. 2013. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Malassezia*. I. Aspekty mikrobiologiczne i immunologiczne. *Postępy Mikrobiologii* 52 (3), str. 295–305.
- Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świderska-Burek U., Jarosz-Wilkotłazka A., Paszczyński A. 2017. Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genome analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 41, str. 941–962. DOI: [10.1093/femsre/fux049](https://doi.org/10.1093/femsre/fux049).
- Kadeřábková N., Mahmood A.J.S., Mavridou, D.A.I. 2024. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *npj Antimicrobial Resistance* 2, nr art. 37. DOI: [10.1038/s44259-024-00051-6](https://doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6).
- Kaper J.B., Morris J.G. Jr, Levine M.M. 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews Journal* 8(1), str. 48–86. DOI: [10.1128/CMR.8.1.48-86](https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48-86).
- Klöckner 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).
- Kowalska A., Walkiewicz K., Kozieł P., Muc-Wierzoń M. 2017. Aflatoksyny – charakterystyka i wpływ na zdrowie człowieka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 71, str. 315–327. DOI: [10.5604/01.3001.0010.3816](https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3816).
- Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. Dostępne online: <https://korid.nil.gov.pl/> (dostęp: 6.03.2024).
- Kralik P., Ricchi M. 2017. A basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology* 8, nr art. 108. DOI: [10.3389/fmicb.2017.00108](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108).
- Krygier B. 2017. Mikrobiologiczne zagrożenia żywności. Narodowe Centrum Edukacji Żywnościowej. Dostępne online: <https://ncez.pzh.gov.pl/informacje-dla-producentow/mikrobiologiczne-zagrozenia-zywnosci/> (dostęp: 6.03.2024).
- Kües U. 2015. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology* 33, str. 268–278. DOI: [10.1016/j.copbio.2015.03.006](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006).
- Kunicka A., Rajkowska K. 2012. Drożdże. W: Libudysz Z., Kowal K., Żakowska Z. (red.), *Mikrobiologia techniczna*. Tom 1: *Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. str. 43–59.
- Kurnatowska A., Khalid K. 2018. Badania diagnostyczne. W: Kurnatowska A., Kurnatowski P. (red.), *Mykologia medyczna*, wyd. 1. Edra Urban & Partner, Wrocław, str. 26–47.
- Kutera-Chrobok K., Klekotka R.B., Symela-Kaspera J., Ślaska-Kaspera A., Dziubdziela W., Markowski J. 2021. Role of the microbiology laboratory tests in diagnosis inflammation of the upper respiratory tract. *Polish Otorhinolaryngology Review* 10(3), str. 13–18. DOI: [10.5604/01.3001.0015.2592](https://doi.org/10.5604/01.3001.0015.2592).
- Lab Tests Online. Dostępne online: www.labtestsonline.pl (dostęp: 06.03.2024).

- Lewandowska Ronnegren A. 2018. Techniki bazujące na hybrydyzacji. W: Lewandowska Ronnegren A. (red.), *Techniki laboratoryjne w biologii molekularnej*, MedPharm Polska, Wrocław, str. 345–352.
- Literacki S., Piechota W., Woźniak-Kosek A. 2019. Diagnostyka laboratoryjna w sepsie. *Forum Zakażeń* 10(6), str. 383–394. DOI: [10.15374/FZ2019063](https://doi.org/10.15374/FZ2019063).
- Macura A.B. 2017a. Mykologia ogólna z patogenizacją zakażeń grzybiczych. W: Heczko P.B., Wróblewska M., Pietrzyk A. (red.), *Mikrobiologia Lekarska*, wyd. 1. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, str. 410–426.
- Macura A.B., Skóra M. 2017. *Grzyby strzępkowe*. W: Heczko P.B., Wróblewska M., Pietrzyk A. (red.), *Mikrobiologia Lekarska*, Wydanie 1. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, str. 442–457.
- Macura A.B. 2017b. *Grzyby dimorficzne*. W: Heczko P.B., Wróblewska M., Pietrzyk A. (red.), *Mikrobiologia Lekarska*, wyd. 1. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, str. 468–475.
- Mahajan R., Sahoo A.K. 2016. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatology Online Journal* 7, str. 7–86. DOI: [10.4103/2229-5178.178099](https://doi.org/10.4103/2229-5178.178099).
- Megighian A., Pirazzini M., Fabris F., Rossetto O., & Montecucco C. 2021. Tetanus and tetanus neurotoxin: From peripheral uptake to central nervous tissue targets. *Journal of Neurochemistry* 158(6), str. 1244–1253. DOI: [10.1111/jnc.15330](https://doi.org/10.1111/jnc.15330).
- 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).
- Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). Dostępne online: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list> (dostęp: 13.03.2024).
- Misra V., Misra S.P., Dwivedi M., Gupta S.C. 1994. The Loeffler's methylene blue stain: an inexpensive and rapid method for detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9(5), str. 512–513. DOI: [10.1111/j.1440-1746.1994.tb01283.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1994.tb01283.x).
- 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).
- Molenda J. 2010. Nowe metody utrwalania żywności. W: Molenda J. (red.), *Mikrobiologia żywności pochodzenia zwierzęcego*, wyd. 1. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, str. 327–339.
- 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. *Mikrobiologia*, wyd. 8. Edra Urban&Partner, Wrocław, str. 306–314.
- 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).
- Najwyższa Izba Kontroli (NIK) o nadzorze nad stosowaniem dodatków do żywności. Dostępne online: <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/e-w-zywnosci-bez-kontroli.html> (dostęp: 13.03.2024).
- Narodowy Program Ochrony Antybiotyków. Dostępne online: <https://antybiotyki.edu.pl/> (dostęp: 6.03.2024).
- Natarajan A., Beena P.M., Devnikar A.V., Mali S. 2020. A systemic review on tuberculosis. *The Indian Journal of Tuberculosis* 67(3), str. 295–311. DOI: [10.1016/j.ijtb.2020.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.02.005).
- Normy mikrobiologiczne dla przypraw. 2019. Bezpieczeństwo Żywności w praktyce. Dostęp on line: <https://bezpieczenstwozywnosci.wip.pl/2019/normy-mikrobiologiczne-dla-przypraw-3773.html> (dostęp: 6.03.2024).
- Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J. 2014. Zagrożenia powstające w żywności minimalnie Przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2(93), str. 5–18. DOI: [10.15193/zntj/2014/93/005-018](https://doi.org/10.15193/zntj/2014/93/005-018).
- OBAS Serwis Alergologiczny. 2025. Dostępne online: www.alergen.info.pl (dostęp: 13.03.2024).

- Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 5 września 2019 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. Dostępne online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20190001923> (dostęp: 6.03.2024).
- Olsen Y., Arildskov E., Hansen S.N., Pedersen M., Dharmage S.C., Kloster M., Sigsgaard T. 2023. Outdoor *Alternaria* and *Cladosporium* spores and acute asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 53(12), str. 1256–1267. DOI: [10.1111/cea.14397](https://doi.org/10.1111/cea.14397).
- Panasiuk A. 2019. *Mikrobiota przewodu pokarmowego*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str. 47–50.
- Peeling R.W., Mabey D., Chen X.S., Garcia P.J. 2023. Syphilis. *Lancet (London, England)* 402(10398), str. 336–346. DOI: [10.1016/S0140-6736\(22\)02348-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02348-0).
- Pilotażowy program profilaktyki nowotworów wątroby poprzez wczesne wykrywanie przewlekłych zakażeń HCV i HBV u dorosłych mieszkańców Polski. Dostępne online: www.watrobanie-boli.pzh.gov.pl/o-programie/diagnostyka-zakazen-wirusowego-zapalenia-watrobty-typu-b-i-c/ (dostęp: 6.03.2024).
- Piotrowska M., Żakowska Z. 2012. Grzyby strzępkowe. W Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (red.), *Mikrobiologia techniczna*. Tom 1: *Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 60–83.
- Pohanka M. 2020. *Bacillus anthracis* as a biological warfare agent: infection, diagnosis and countermeasures. *Bratislavske Lekarske Listy* 121(3), str. 175–181. DOI: [10.4149/BLL_2020_026](https://doi.org/10.4149/BLL_2020_026).
- Polskie Stowarzyszenie Sterylizacji Medycznej. Dostępne online: <http://sterylizacja.org.pl/> (dostęp: 12.03.2024).
- Polskie Towarzystwo Mykologiczne. Dostępne online: <https://www.ptmyk.pl> (dostęp: 13.03.2024).
- Prajapati V., Karen H.D., Prajapati P.H., Sen D.J., Patel C.N. 2018. Chemistry and histochemistry of Gram staining of dyes on bacterial peptidoglycan. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 7, str. 490–535. DOI: [10.20959/wjpr201816-13226](https://doi.org/10.20959/wjpr201816-13226).
- 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).
- Rawson A.M., Dempster A.W., Humphreys C.M., Minton N.P. 2023. Pathogenicity and virulence of *Clostridium botulinum*. *Virulence* 14(1), nr art. 2205251. DOI: [10.1080/21505594.2023.2205251](https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2205251).
- 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).
- 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).
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 5 września 2019 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. Dostępne online: <https://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20190001923> (dostęp: 6.03.2024).
- Różańska A. 2020. Dezynfekcja i sterylizacja. W: Bulanda J., Szostek S. (red.), *Podstawy mikrobiologii i epidemiologii szpitalnej*, wyd. 1. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, str. 295–306.
- 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).
- Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., van Duijkeren E., Johnson A.P., Gastra W. 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, str. 601–604. DOI: [10.1093/jac/dkq037](https://doi.org/10.1093/jac/dkq037).
- 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).

- Slouha E., Al-Geizi H., Albalat B.R., Burle V.S., Clunes L.A., Kollias T.F. 2023. Sex Differences in Infective Endocarditis: A Systematic Review. *Cureus* 15(12), nr art. 49815. DOI: [10.7759/cureus.49815](https://doi.org/10.7759/cureus.49815).
- Słaba M., Różalska S. 2020. Grzyby należące do Mucoromycota, Ascomycota i Basidiomycota – cechy morfologiczne, biochemiczne i analiza genetyczna. W: Długoński J. (red.), *Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce. Teoria, ćwiczenia i pracownie specjalistyczne*, Wydanie 1. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, str. 163–183.
- 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/MMBR.00020-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10).
- Sokół-Leszczyńska B., Sztark E., Leszczyński P., Młynarczyk G., Wróblewska M. 2012. Przygotowanie instrumentarium medycznego do zabiegów chirurgicznych. Część II – sterylizacja i reprocessowanie. *Postępy Mikrobiologii* 51(4), str. 315–321.
- Solnica B., Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W. 2022. *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, wyd. 5. Wydawnictwo Edra Urban & Partner, Wrocław, str. 931–949.
- Strnad M., Rudenko N., Rego R.O.M. 2023. Pathogenicity and virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Virulence* 14(1), nr art. 2265015. DOI: [10.1080/21505594.2023.2265015](https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2265015).
- Sugawara-Mikami M., Tanigawa K., Kawashima A., Kiriya M., Nakamura Y., Fujiwara Y., Suzuki K. 2022. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence* 13(1), str. 1985–2011. DOI: [10.1080/21505594.2022.2141987](https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2141987).
- Szewczyk E.M. 2019. *Diagnostyka bakteriologiczna*, wyd. 3. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Talapko J., Juzbašić M., Matijević T., Pustijanac E., Bekić S., Kotris I., Škrlec I. 2021. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 7(2), nr art. 79. DOI: [10.3390/jof7020079](https://doi.org/10.3390/jof7020079).
- Tavman S., Otles S., Glau S., Gogus N. 2019. *Food preservation technologies*. W: Galanakis Ch.M. *Saving Food. Production, Supply Chain, Food Waste and Food Consumption*, Academic Press, str. 117–140 DOI: [10.1016/B978-0-12-815357-4.00004-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815357-4.00004-3).
- Tille P.M. 2017. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, wyd. 14. Elsevier, St. Louis, str. 265–266. Uses Of Microbial Enzymes In Industries. Dostępne online: <https://infinitabiotech.com/blog/uses-of-microbial-enzymes/> (dostęp: 12.03.2024).
- Wang H., Liu D., Zhou X. 2023. Effect of Mycolic Acids on Host Immunity and Lipid Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 25(1), nr art. 396. DOI: [10.3390/ijms25010396](https://doi.org/10.3390/ijms25010396).
- 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).
- Wróblewska M., Dzieciatkowski T. 2017. *Choroby wirusowe w praktyce klinicznej*, wyd. 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str. 56–57.
- Vasam M., Korutla S., Bohara R.A. 2023. Acne vulgaris: A review of the pathophysiology, treatment, and recent nanotechnology-based advances. *Biochemistry and Biophysics Reports* 36, nr art. 101578. DOI: [10.1016/j.bbrep.2023.101578](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101578).
- Vijayakumar T., Divya B., Vasanthi V., Narayan M., Kumar A.R., Krishnan R. 2023. Diagnostic Utility of Gram Stain for Oral Smears - A Review. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 11(3), str. 130–134. DOI: [10.4103/jmau.jmau_108_22](https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_108_22).
- Załęska-Ponganis J., Wolska M., Jackowska T. 2016. Zakażenia układu moczowego u dzieci – wybrane aspekty postępowania na podstawie aktualnych zaleceń. *Postępy Nauk Medycznych* 29(6), str. 429–435.
- Zarys.pl [b.r.] Woreczki do pobierania próbek moczu. Dostępne online: https://zarys.pl/oferty/katalogi/#flipbook-df_668 (dostęp: 22.09.2025).
- Zhou L.W., May T.W. 2022. Fungal taxonomy: current status and research agendas for the interdisciplinary and globalisation era. *Mycology* 14(1), str. 52–59. DOI: [10.1002/9780471729259.mca03cs15](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15).

