

mgr Agata Jaworska

**Ocena występowania nosicielstwa *Staphylococcus aureus*
i *Chlamydia pneumoniae* w jamie nosowo-gardłowej
u zdrowych, dorosłych osób.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2018

Słowa kluczowe: *S. aureus*, *C. pneumoniae*, nosicielstwo, PCR, metody immunoenzymatyczne (ELISA)

Promotorowi,
Panu dr. hab. n. med. Tomaszowi M. Karpińskiemu
pragnę złożyć serdeczne podziękowania
za poświęcony czas, wszechstronną pomoc w realizacji niniejszej pracy,
wsparcie oraz okazaną życzliwość.

Pracownikom
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
składam serdeczne podziękowania
za nieocenioną pomoc, życzliwość oraz wsparcie
w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Pracę tą dedykuję mojej rodzinie i bliskim,
dziękując równocześnie za wiarę i motywację
oraz wsparcie w trakcie jej realizacji.

Spis treści

Spis treści.....	6
Wykaz stosowanych skrótów	8
1. Wstęp	10
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.1.2. Budowa i czynniki wirulencji <i>S. aureus</i>	12
1.1.3. Nosicielstwo <i>S. aureus</i>	17
1.1.4. Chorobotwórczość <i>S. aureus</i>	19
1.1.5. Biofilm.....	21
1.1.6. Globalne systemy regulacji ekspresji genów	23
1.1.7. Diagnostyka.....	26
1.1.8. Leczenie	28
1.2. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	30
1.2.1. Charakterystyka rodzaju <i>Chlamydia</i>	30
1.2.2. Epidemiologia.....	33
1.2.3. Chorobotwórczość <i>C. pneumoniae</i> i potencjalne powikłania zakażeń	34
1.2.4. Diagnostyka zakażeń <i>C. pneumoniae</i>	36
1.2.5. Leczenie	39
2. Cele pracy	41
3. Materiał i metody	42
3.1. Materiał	42
3.1.1. Dobór pacjentów	42
3.1.2. Izolaty <i>S. aureus</i>	43
3.1.3. Materiał genetyczny.....	43
3.1.4. Surowica.....	43

3.2.	Metody badawcze	44
3.2.1.	Hodowla, identyfikacja i oznaczenie lekowrażliwości <i>S. aureus</i>	44
3.2.2.	Izolacja genomowego DNA	48
3.2.3.	Diagnostyka molekularna	50
3.2.4.	Diagnostyka immunoenzymatyczna	55
3.3.	Analiza statystyczna	58
4.	Wyniki.....	59
4.1.	<i>S. aureus</i>	59
4.1.1.	Ocena stopnia nosicielstwa <i>S. aureus</i>	59
4.1.2.	Ocena lekowrażliwości uzyskanych izolatów <i>S. aureus</i>	59
4.1.3.	Ocena grup specyficzności genów regulatorowych <i>agr</i>	60
4.2.	<i>C. pneumoniae</i>	63
4.2.1.	Ocena występowania <i>C. pneumoniae</i>	63
4.2.2.	Ocena występowania przeciwciał anti- <i>C. pneumoniae</i>	63
5.	Omówienie wyników i dyskusja	65
6.	Wnioski.....	74
7.	Streszczenie w języku polskim	75
8.	Streszczenie w języku angielskim/ Abstract	78
9.	Spis tabel, rycin i wykresów.....	81
9.1.	Spis tabel	81
9.2.	Spis rycin	81
9.3.	Spis wykresów	82
10.	Literatura	83

Wykaz stosowanych skrótów

- AD – choroba Alzheimera (ang. Alzheimer's disease)
- Agr – system globalnej regulacji genów (ang. accessory gene regulator)
- AIP – peptyd, autoinduktor systemu *agr* (ang. autoinducing peptide)
- CA-MRSA – środowiskowe szczepy MRSA (ang. community-acquired methicillin resistant *S. aureus*)
- CDC – Centra Kontroli i Prewencji Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention)
- ClfB – czynnik skupiania B (ang. clumping factor B)
- cLPS – lipopolisacharyd charakterystyczny dla *C. pneumoniae* (ang. chlamydial lipopolisacharide)
- EB – ciało elementarne *C. pneumoniae* (ang. elementary body)
- eDNA – zewnątrzkomórkowe DNA (ang. extracellular DNA)
- ELISA – metoda immunoenzymatyczna (ang. enzyme-linked immuno-adsorbent assay)
- HA-MRSA – szczepy MRSA związane ze środowiskiem szpitalnym (ang. hospital-acquired methicillin resistant *S. aureus*)
- hsp – białka szoku termicznego (ang. heat shock protein)
- MHC – kompleks zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
- MIF – mikroimmunofluorescencja (ang. microimmunofluorescence)
- MRSA – metycylinooporne szczepy *S. aureus* (ang. methicillin resistant *S. aureus*)
- MS – stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis)
- MSCRAMMs – białka powierzchniowe rozpoznające cząsteczki macierzy pozakomórkowej gospodarza (ang. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)
- MSSA – metycylinowrażliwe szczepy *S. aureus* (ang. methicillin sensitive *S. aureus*)
- omp - białka błony zewnętrznej *C. pneumoniae* (ang. outer membrane protein)
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- PB – ciało przetrwałe *C. pneumoniae* (ang. persistent body)
- PBP – białka wiążące penicyliny (ang. penicillin binding protein)
- PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. polymerase chain reaction)

PIA – polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa (ang. polysaccharide intracellular adhesin)

POChP – przewlekła obturacyjna choroba płuc

PSM – mały peptyd wydzielniczy (ang. phenol soluble modulín)

PVL – leukocydyna Panton-Valentine (ang. Panton-Valentine Leukocidin)

RB – ciało siateczkowate *C. pneumoniae* (ang. reticulate body)

SSSS – gronkowcowy zespół oparzonej skóry (ang. staphylococcal scaled skin syndrome)

TSS – zespół wstrząsu toksycznego (ang. toxic shock syndrome)

VISA – szczepy *S. aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (ang. vancomycin intermediate *S. aureus*)

VRSA – wankomycynooporne szczepy *S. aureus* (ang. vancomycin resistant *S. aureus*)

1. Wstęp

Bakterie należące do rodzaju *Staphylococcus* są jednymi z najlepiej zbadanych i poznanych drobnoustrojów związanych z człowiekiem. Gronkowce wchodzą w skład fizjologicznej mikroflory człowieka. Kolonizują przede wszystkim skórę i błony śluzowe górnych dróg oddechowych oraz przewodu pokarmowego. Równocześnie, niektóre gatunki mogą być przyczyną wielu stanów chorobowych. Najważniejszym gatunkiem tego rodzaju jest *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Może on być czynnikiem etiologicznym wielu zakażeń, zarówno szpitalnych, jak i pozaszpitalnych [1, 2]. Wysoki potencjał chorobotwórczy gronkowca złocistego warunkowany jest przez szereg czynników wirulencji [3].

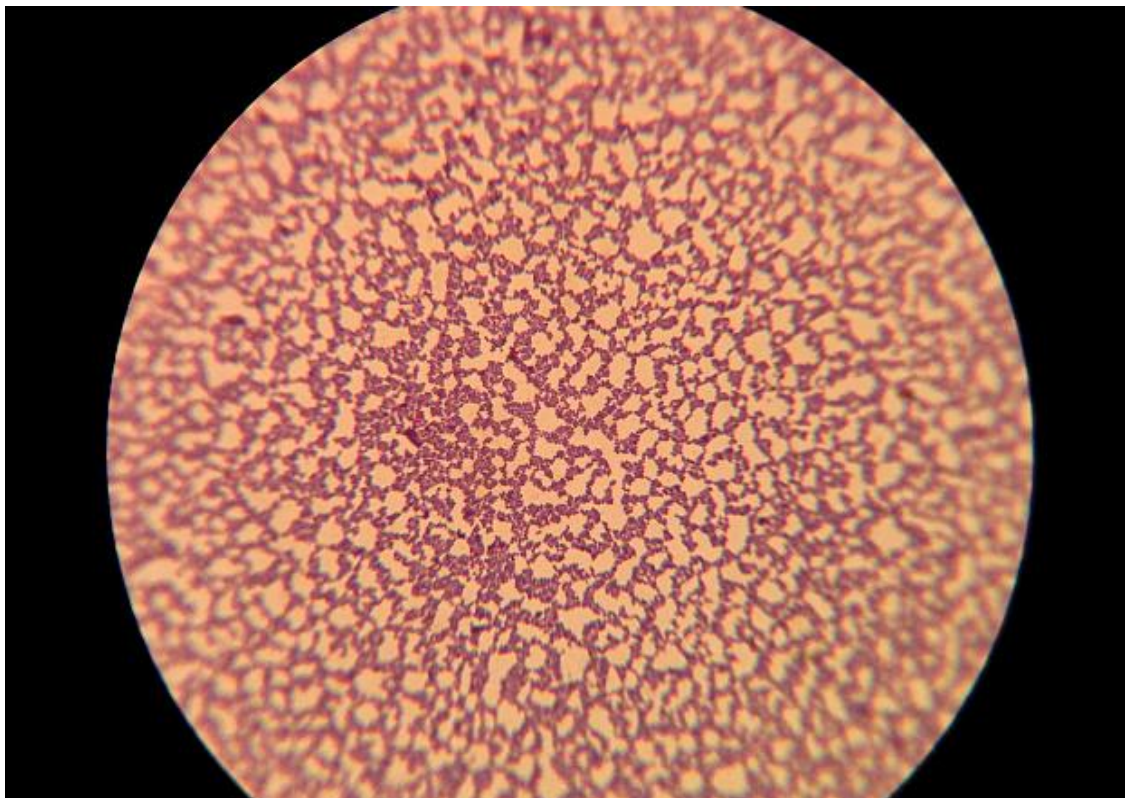
Rodzaj *Chlamydia* obejmuje kilka gatunków drobnoustrojów chorobotwórczych zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt. Największe znaczenie kliniczne dla człowieka mają gatunki *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), *C. trachomatis* oraz *C. psittaci*. Chorobotwórczość *C. trachomatis* jest związana głównie z układem moczowo-płciowym. *C. psittaci* jest czynnikiem etiologicznym sporadycznie występującej zoonozy – ornitozy. *C. pneumoniae* to gatunek, który wywołuje zakażenia w obrębie układu oddechowego. Jednak większość infekcji o etiologii *C. pneumoniae* przebiega bezobjawowo. Sugeruje się, że chroniczne zakażenia wywołane tym drobnoustrojem mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju schorzeń przewlekłych, między innymi astmy, niedokrwiennej choroby serca czy chorób neurodegeneracyjnych [4, 5].

Bezobjawowa kolonizacja gronkowcem złocistym i *C. pneumoniae* może stanowić źródło zakażenia tymi drobnoustrojami. Ocena występowania nosicielstwa tych mikroorganizmów w jamie nosowo-gardłowej jest niezwykle istotna w kontekście powikłań, jakie mogą być ich potencjalnymi następstwami. Pomimo różnic występujących między tymi mikroorganizmami konsekwencje zakażeń nimi mogą prowadzić do stanów zagrażających zdrowiu i życiu człowieka.

1.1. *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Charakterystyka *S. aureus*

Gronkowce złociste to Gram-dodatnie ziarniaki układające się w preparatach wykonanych z hodowli na podłożu stałym w charakterystyczne skupiska przypominające grona. W preparatach z podłoża płynnych przyjmują częściej postać łańcuszków, dwoinek i czworaczków. Wielkość komórek z reguły nie przekracza 1 μm (Ryc. 1.1.). Są to drobnoustroje względnie beztlenowe, nie wykazujące ruchu. Gronkowce nie mają dużych wymagań odżywczych, są zdolne do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (18 – 40°C) oraz pH, na zwykłych podłożach bakteriologicznych. Charakteryzują się zdolnością do produkcji katalazy [6, 7].



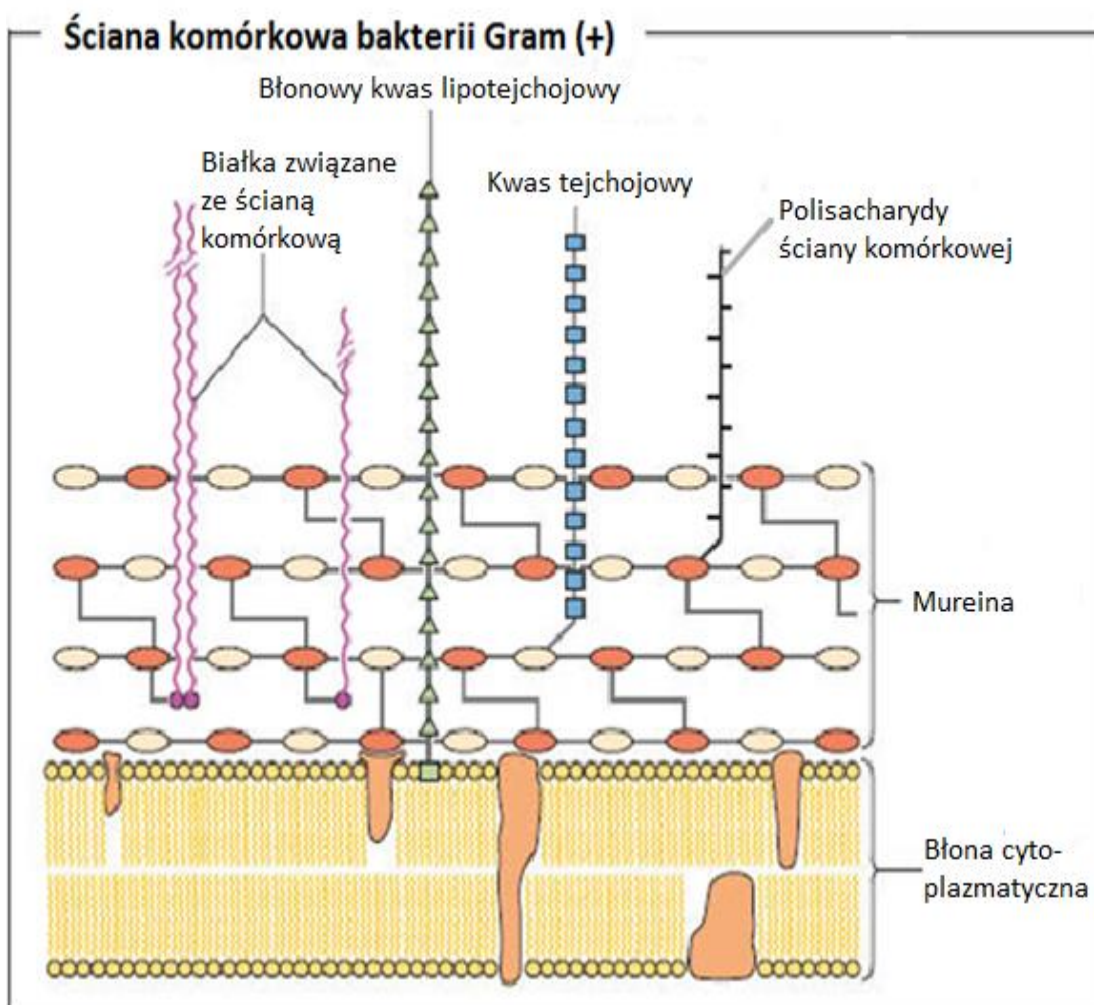
Rycina 1.1. *S. aureus* w preparacie z podłoża stałego barwionym metodą Grama [zdjęcie T. Karpiński].

Ściana komórkowa

Gronkowce otoczone są ścianą komórkową składającą się z kilkudziesięciu warstw peptydoglikanu (syn. mureina) – złożonego polimeru zbudowanego z reszt kwasu N-acetylmuraminowego i N-acetyloglukozaminy, o grubości 20 – 35 nm. W syntezie peptydoglikanu biorą udział enzymy: białka wiążące penicyliny (ang. penicillin binding protein, PBP). Kluczową rolę ściany komórkowej jest ochrona bakterii przed uszkodzeniami zewnętrznymi i zmianami ciśnienia osmotycznego. Tylko u gatunku *S. aureus* ugrupowania boczne ulegają sieciowaniu mostkami pentaglicynowymi. Są one zdolne do wiązania się z L-lizyną jednego i D-alaniną kolejnego łańcucha oligopeptydowego, tworząc w ten sposób kilkadziesiąt usieciowanych warstw usztywniających ścianę komórkową bakterii (Ryc. 1.2.) [8, 9].

Istotnym elementem ściany komórkowej gronkowców są kwasy tejchojowe, będące polimerami swoistymi dla danego gatunku. Wiążą się one kowalencyjnie z resztami kwasu N-acetylmuraminowego lub z kwasami lipotejchojowymi (lipidami zakotwiczonymi w błonie cytoplazmatycznej). Połączenie z oligopeptydami mureiny warunkuje specyficzną aktywność immunogenną kwasów tejchojowych. Biorą one również udział w procesie adhezji do białek macierzy pozakomórkowej gospodarza [9, 10].

Kolejny ważny element ściany komórkowej, związany z błoną cytoplazmatyczną i z peptydoglikanem to **białko A**. Występuje u wszystkich szczepów *S. aureus*. Funkcja tego białka skorelowana jest z jego powinowactwem i wiązaniem się do receptorów Fc różnych podklas immunoglobulin klasy IgG. W wyniku tej reakcji dochodzi do inhibicji odpowiedzi humoralnej gospodarza, co w konsekwencji chroni drobnoustroj przed opsonizacją i fagocytozą. Białko A odgrywa więc istotną rolę w procesie adaptacji danego szczepu do środowiska immunologicznego gospodarza [11, 12].



Rycina 1.2. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich (wg Kayser i wsp. [13], modyfikacja własna).

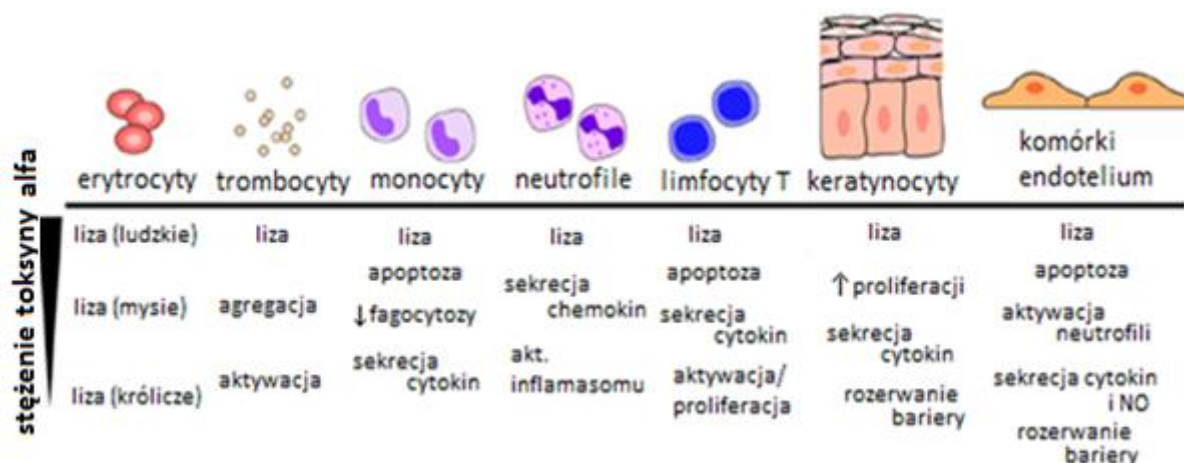
Otoczka

Zewnętrzną część ściany komórkowej gronkowców złocistych pokrywa cienka, ochronna warstwa zbudowana z polisacharydów. Związki te są zakotwiczone w warstwie peptydoglikanu ściany komórkowej i tworzą otoczkę. Podstawową funkcją otoczki jest ochrona drobnoustroju przed zmieniającymi się warunkami środowiska zewnętrznego. W czasie zakażenia otoczka hamuje opsonizację i fagocytozę. Polisacharydy otoczki są zbudowane z powtarzających się podjednostek różniących się między szczepami, co pozwala dzielić je na serotypy. U *S. aureus* wyróżnia się 13 serotypów otoczkowych. Z zakażeń inwazyjnych najczęściej izoluje się drobnoustroje z serotypem otoczkowym 5 i 8 [14].

Czynniki wirulencji

S. aureus jest zdolny do produkcji wielu toksyn i enzymów pozakomórkowych, będących głównymi czynnikami warunkującymi wirulencję danego szczepu i odpowiedzialnymi za jego chorobotwórczość. Substancje wydzielane przez gronkowce złociste mogą niszczyć lokalną barierę immunologiczną gospodarza oraz zapewniają drobnoustrojom niezbędne do wzrostu i rozmnażania składniki odżywcze. W konsekwencji toksyny i enzymy produkowane przez *S. aureus* ułatwiają bakteriom kolonizację miejsca infekcji, a następnie rozprzestrzenienie się w organizmie gospodarza [15].

Jedna z najlepiej poznanych i zbadanych cytotoksyn to **toksyna alfa**, będąca hemolizyną. Jest ona zdolna do wiązania się z hydrofobowymi elementami błon komórkowych i tworzenia w nich porów, przez które mogą być transportowane małe jony. Proces ten prowadzi do efluksu i śmierci komórki. Działanie tej hemolizyny na poszczególne komórki jest zależne od jej stężenia (Ryc. 1.3.). Udowodniono, że komórki wrażliwe na działanie toksyny alfa posiadają na swojej powierzchni receptor – metaloproteinazę zależną od cynku (ang. a disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10). Toksyna alfa działa letalnie m.in. na erytrocyty, limfocyty T i B, monocyty, trombocyty, komórki endotelium naczyń krwionośnych [16, 17, 18].



Rycina 1.3. Odpowiedź wybranych komórek na intoksykację toksyną alfa, zależna od stężenia toksyny (wg Berube i wsp. [19], modyfikacja własna).

Toksyna beta (sfingomielinaza C) to białko katalizujące proces hydrolizy fosfolipidów zawartych w błonach komórkowych. Aktywność ta wynika z powinowactwa do sfingomieliny i lizofosfatydylocholiny obecnych w błonach komórkowych. Sfingomielinaza C jest toksyczna przede wszystkim dla erytrocytów, limfocytów, monocytów, neutrofili i keratynocytów. Sugeruje się, że toksyna beta bierze udział w tworzeniu biofilmu. Za kodowanie tej toksyny odpowiedzialny jest gen *hlyB*, ale jego ekspresję u większości szczepów *S. aureus* hamuje obecność bakteriofaga ϕ Sa3 [15, 20].

Kolejna hemolizyna – **toksyna delta** – wykazuje powinowactwo do lipidów błon komórkowych i działając jak surfaktant wywołuje ich lizę. Toksyna ta należy do grupy małych peptydów wydzielniczych nazywanych **PSM** (ang. phenol soluble modulins). Wyróżniamy wśród nich dwie podrodziny: PSM α i PSM β . Peptydy te wykazują bardzo silną aktywność cytolityczną i są zdolne do wywołania reakcji zapalnej (zdecydowanie silniejsze właściwości w tym zakresie wykazują PSM α). Sugeruje się, że PSMs biorą również udział w dojrzewaniu biofilmu. Pozostają pod kontrolą genów regulatorowych *agr* (ang. accessory gene regulator) [17, 21].

Część szczepów *S. aureus* produkuje również dwuskładnikowe toksyny zbudowane z dwóch łańcuchów polipeptydowych – jednego białka S i jednego białka F. Obecnie zidentyfikowano trzy białka S (HlgA, HlgC, LukS-PV) i dwa białka F (HlgB, LukF-PV). Najlepiej poznanymi toksynami z tej grupy są **toksyna gamma** o aktywności hemolitycznej oraz cytotoksyczna tylko dla neutrofili **leukocydyna Panton-Valentine** (ang. Panton-Valentine Leukocidin PVL) [11, 21]. Dowiedziono, że toksyna PVL dopiero w wysokich stężeniach wykazuje działanie toksyczne dla białych krwinek. Natomiast niewielkie, sublityczne stężenia, mogą aktywować neutrofile i granulocyty oraz stymulować je do produkcji cytokin prozapalnych. PVL jest produkowana głównie przez środowiskowe szczepy metycyloopornych *S. aureus* (ang. community-associated methicillin resistant *S. aureus*, CA-MRSA) i może służyć jako marker tych szczepów [22].

Kolejnymi białkami będącymi istotnymi czynnikami wirulencji gronkowców złocistych są **eksfoliatyny**. Toksyny te wykazują aktywność proteaz serynowych. Prowadzą do hydrolizy desmogleiny, odpowiedzialnej za tworzenie połączeń międzykomórkowych w warstwie ziarnistej naskórka,

powodując powstanie pęcherzy i pełzanie naskórka. Obecnie znamy dwie formy eksfoliatyn: ETA i ETB [23].

Szczepy *S. aureus* będące czynnikami etiologicznymi zatruć pokarmowych produkują również **enterotoksyny**. Do tej pory zidentyfikowano 21 białek wykazujących aktywność enterotoksyczną, w tym pięć klasycznych enterotoksyn (SEA – SEE). Są to pozakomórkowe proteiny rozpuszczalne w wodzie, niewrażliwe na działanie wysokiej temperatury oraz enzymów trawiennych – właściwości te warunkują ich potencjał chorobotwórczy. Enterotoksyny wpływając na receptory neuronalne w jelicie pobudzają ośrodek wymiotny w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Dodatkowo, wywołując stan zapalny mogą również pobudzać perystaltykę przewodu pokarmowego i być przyczyną biegunki [24].

W szczególnych warunkach (obojętne pH i podwyższone stężenie tlenu) niektóre szczepy gronkowców złocistych są zdolne do produkcji **toksyny-1 wstrząsu toksycznego** (ang. toxic shock syndrome toxin-1, **TSST-1**). Białko to wykazuje podobieństwo w budowie strukturalnej do enterotoksyn. W zależności od stężenia toksyna ta może uszkadzać błony cytoplazmatyczne komórek bądź wywoływać efekt cytotoksyczny. Ze względu na zdolność penetrowania błon śluzowych TSST-1 może być przyczyną zakażeń ogólnoustrojowych. Jednak najważniejszą funkcją toksyny wstrząsu toksycznego jest indukcja produkcji interleukiny-1, interleukiny-2 i TNF α (ang. tumor necrosis factor α), które działają prozapalnie [17].

Zarówno enterotoksyny jak i TSST-1 to superantygeny. Są zdolne do bezpośredniego łączenia się z cząsteczkami kompleksu zgodności tkankowej klasy II (ang. major histocompatibility complex, MHC) z pominięciem etapu prezentacji przez komórki prezentujące antygen. Rola tych białek polega przede wszystkim na niespecyficznym pobudzeniu dużej ilości limfocytów T, które skutkuje produkcją cytokin prozapalnych. Superantygeny są zdolne do stymulacji i gromadzenia m.in. eozynofili i komórek tucznych. Dzięki tym funkcjom umożliwiają drobnoustrojom uniknięcie mechanizmów obronnych ze strony gospodarza i skuteczną kolonizację [11, 25].

Na chorobotwórczość *S. aureus* mają również wpływ produkowane przez drobnoustroje enzymy. Jednym z najważniejszych, zarówno z punktu widzenia

wirulencji jak i diagnostyki, jest **koagulaza**. Białko to, podobnie jak trombina, przekształca fibrynogen w fibrynę, wskutek czego następuje nieenzymatyczne wykrzepianie osocza. W organizmie gospodarza mikrokolonie *S. aureus* otoczone przez warstwy fibryny są chronione przed fagocytozą. Koagulaza odgrywa również ważną rolę w adhezji do cewników i innych wyrobów medycznych [26]. Kolejnym istotnym enzymem jest **stafylokinaza**. Poprzez aktywację plazminogenu do plazminy umożliwia ona *S. aureus* rozprzestrzenienie się w organizmie z miejsca pierwotnej infekcji [17].

Gronkowce złociste produkują również szereg innych enzymów odpowiedzialnych głównie za degradowanie i niszczenie tkanek. Są to przede wszystkim: hialuronidaza, lipazy, fosfolipazy, nukleazy, proteiny serynowe i inne [17].

1.1.3. Nosicielstwo *S. aureus*

Niszą ekologiczną najczęściej zajmowaną u człowieka przez *S. aureus* są nozdrza przednie [1, 27]. Udokumentowano też możliwą kolonizację m.in. gardła, jelit, skóry krocza i odbytu [3]. Ze względu na częstotliwość występowania gronkowca złocistego w badaniach przesiewowych, wyodrębniono dwie kategorie nosicieli:

- nosicieli stałych – u pacjenta prawie zawsze stwierdzamy w posiewie obecność tego samego szczepu *S. aureus*,
- nosicieli okresowych – obecność *S. aureus* stwierdza się z różną częstotliwością, z przerwami, mogą być to różne szczepy [27, 28].

Szacuje się, że nosicielstwo stałe występuje u około 20 – 30 % populacji, częściej dotyczy dzieci niż osób dorosłych. W Polsce stwierdza się nosicielstwo u 28 % społeczeństwa [29, 30]. „Wzór” nosicielstwa może się zmienić w okresie dojrzewania. Badania wskazują, że około 60 % populacji to nosiciele okresowi [27, 28].

Pierwotnym miejscem kolonizacji *S. aureus* jest przedsionek jamy nosowej wyścielany nabłonkiem płaskim, w którym znajdują się gruczoły łojowe i mieszki włosowe. Drobnoustroje stanowiące fizjologiczną mikroflorę pokryte są produkowaną przez gruczoły warstwą śluzu, w skład którego wchodzi

glikoproteiny, lipidy oraz różne substancje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (lizozym, laktoferyna, wydzielnicze przeciwciała klasy IgA) [29]. Stwierdzono, że mechanizmy wrodzonej odporności immunologicznej gospodarza wpływają na obniżenie poziomu nosicielstwa. Szczególną rolę w tym zakresie odgrywają defensyny [32, 33].

Nabłonek płaski ulega keratynizacji tworząc warstwę rogową. W proces rogowacenia zaangażowane jest wiele białek, w tym lorykryna. Sugeruje się, że lorykryna pełni istotną rolę w adherencji *S. aureus*, gdyż stanowi ligand dla czynnika skupiania B (ang. clumping factor B, ClfB) znajdującego się na powierzchni gronkowców złocistych [34]. Oprócz ClfB również kwasy tejchojowe, szereg adhezyn oraz białek powierzchniowych rozpoznających cząsteczki macierzy pozakomórkowej gospodarza (ang. microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs) bierze udział w adhezji do komórek gospodarza. Jako ligandy dla tych cząsteczek rozpoznano przede wszystkim fibrynogen, elastynę, kolagen i czynnik von Willebranda [3, 35].

Badania genetyczne nie wykazały do tej pory istnienia specyficznego czynnika bakteryjnego związanego swoiście ze stałym nosicielstwem gronkowca złocistego [36, 37].

Na bezobjawową kolonizację *S. aureus* wpływa wiele czynników, zarówno związanych z gospodarzem jak i z drobnoustrojem. Dowiedziono, że poziom nosicielstwa zależy między innymi od wieku, płci, poziomu glukozy w surowicy krwi, stosowania doustnej antykoncepcji, palenia papierosów, dializowania, narkomanii. Również choroby, takie jak np. atopowe zapalenie skóry czy ziarniniak Wegenera predysponują do kolonizacji gronkowcem złocistym [3, 27].

Sugeruje się, że obecność niektórych gatunków bakterii w fizjologicznej mikroflorze przedsionka nosa może redukować kolonizację *S. aureus*. Do takich drobnoustrojów można zaliczyć niektóre szczepy *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* czy *Pronionibacterium granulosum*. Wiąże się to najprawdopodobniej z wydzielaniem przez te gatunki substancji hamujących wzrost *S. aureus* [31, 37, 38].

Interakcje między drobnoustrojem, a gospodarzem warunkujące proces przylegania i kolonizacji nadal nie są do końca poznane.

Gronkowiec złocisty jest zewnątrzkomórkowym patogenem szeroko rozpowszechnionym na świecie. Bezobjawowa kolonizacja *S. aureus* może stanowić endogenne źródło infekcji oraz przyczynia się do wzrostu częstotliwości zachorowań w populacji poprzez transmisję drobnoustroju drogą kropelkową. Do zakażenia może dojść również na drodze kontaktu bezpośredniego czy pośredniego [39].

S. aureus stanowi czynnik etiologiczny wielu chorób, jest zdolny do wywołania infekcji w każdym układzie ludzkiego organizmu.

Wiele zakażeń gronkowcowych dotyczy skóry i tkanek miękkich, z reguły przebiegających z udziałem procesu ropnego. Można tu wymienić schorzenia takie jak czyrak (Ryc. 1.4.), jęczmień, liszajec zakaźny, zapalenie mieszków włosowych, zastrzał, cellulitis oraz gronkowcowy zespół oparzonej skóry (ang. staphylococcal scaled skin syndrome, SSSS) – szczególną rolę w powstaniu SSSS odgrywają wspomniane wcześniej eksfoliatyny. *S. aureus* jest też czynnikiem etiologicznym zakażeń ran pooperacyjnych [26, 40].

Ponadto patogen ten może być przyczyną infekcji górnych dróg oddechowych, np. zapalenia gardła, migdałków, zatok przynosowych, ucha środkowego [25], oraz dolnych dróg oddechowych – przede wszystkim zapalenia oskrzeli, płuc i opłucnej [11].

S. aureus może stanowić czynnik etiologiczny zakażeń układu moczowego, zapalenia wsierdza i mięśnia sercowego, zapalenia kości i szpiku kostnego, ropni narządowych, głównie ropni mózgu. Może być przyczyną zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, przede wszystkim u dorosłych. U osób po zabiegach chirurgicznych czy z obniżoną odpornością gronkowiec złocisty może wywołać posocznice zagrażającą życiu pacjenta [40, 41].

Swoistym zespołem chorobowym o etiologii *S. aureus* jest zespół wstrząsu toksycznego (ang. toxic shock syndrome, TSS), który może być wynikiem zakażenia szczepem gronkowca złocistego posiadającym gen *tst* i zdolnym do produkcji toksyny TSST-1. TSS to ciężka toksykoza, objawiająca się klinicznie gorączką, wysypką, obniżeniem ciśnienia krwi i wstrząsem. Zespół

po raz pierwszy został opisany u kobiet stosujących tampony, obecnie występuje głównie u osób po zabiegach chirurgicznych i operacjach [42].



Rycina 1.4. Pacjent z czyrakiem wywołanym przez *S. aureus* MSSA, który zgłosił się na badanie do Pracowni Usługowej Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu [zdjęcie: Joanna Bogajczyk].

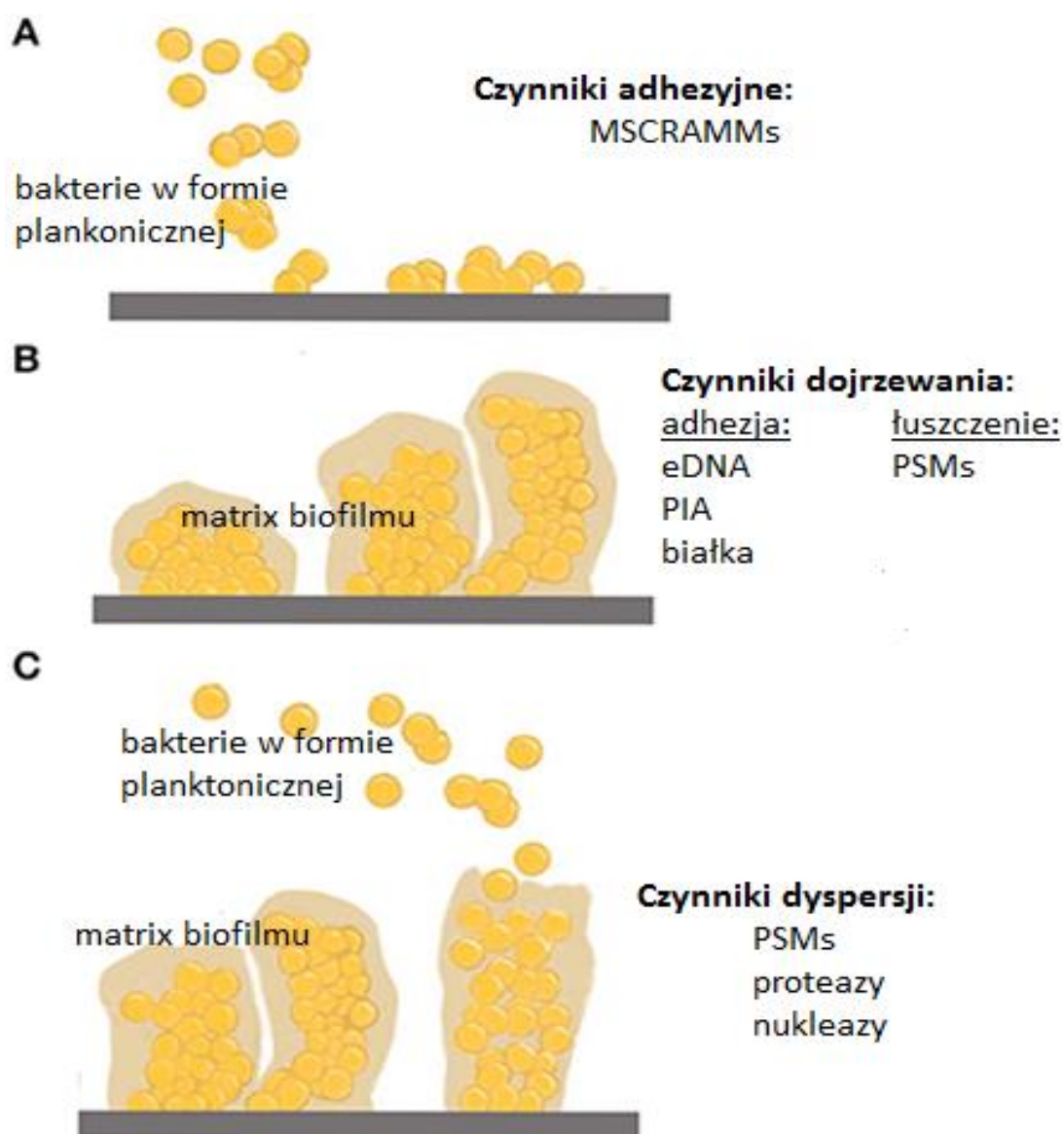
Szczególnym rodzajem infekcji wywoływanych przez *S. aureus* są gronkowcowe zatrucia pokarmowe. Dochodzi do nich w wyniku spożycia pokarmów zanieczyszczonych enterotoksynami. Wyróżniamy intoksykację o charakterze pierwotnym (produkty spożywcze pochodzące od chorych zwierząt, np. mleko czy mięso) oraz wtórny (zanieczyszczenie żywności w czasie jej produkcji, przede wszystkim przez nosicieli szczepów enterotoksynotwórczych lub osoby z gronkowcowymi chorobami skóry). Zatrucia pokarmowe cechują się krótkim okresem wylęgania (od kilkudziesięciu minut do kilku godzin), zwykle ustępują samoistnie. Często mają charakter epidemiczny [24].

W ostatnich latach analizuje się dokładnie powstawanie i rolę biofilmu w chorobotwórczości wielu drobnoustrojów, w tym również *S. aureus*. Biofilm można zdefiniować jako drobnoustroje prowadzące osiadły tryb życia, osadzone w produkowanej przez siebie polimerycznej substancji pozakomórkowej. Bakterie żyjące w biofilmie charakteryzują się odmiennym fenotypem, inną ekspresją genów, produkcją odrębnego zestawu białek, a także lekowrażliwością odmienną niż u drobnoustrojów w formie planktonicznej [43].

Udowodniono, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy nosicielstwem gronkowca złocistego, a ryzykiem wystąpienia zakażeń szpitalnych [44]. Sugeruje się, że kolonizacja przedsionka nosa zapewnia tym drobnoustrojom podstawę do rozprzestrzeniania się na inne powierzchnie ciała, a także transmisję do krwioobiegu, np. poprzez uszkodzony naskórek. *S. aureus* początkowo wykazuje wzrost w formie planktonicznej, ale szybko dochodzi do wytworzenia czynników adherencji, przylegania do białek zewnątrzkomórkowych gospodarza i produkcji biofilmu [43].

Adhezja jest pierwszym etapem formowania biofilmu, w którym MSCRAMMs tworzą niekowalencyjne połączenia z białkami gospodarza. Badania *in vitro* sugerują, że istotne w tym procesie są również kwasy tejchojowe. W kolejnym etapie – stadium dojrzewania, drobnoustroje produkują macierz pozakomórkową, złożoną przede wszystkim z egzopolisacharydów, w tym PIA (ang. polysaccharide intracellular adhesin), białek oraz zewnątrzkomórkowego DNA (ang. extracellular DNA, eDNA). W strukturze biofilmu tworzą się kanały, które umożliwiają dostęp składników odżywczych do drobnoustrojów znajdujących się w głębszych warstwach. Ostatnią fazą rozwoju biofilmu jest odrywanie się jego fragmentów (nazywane też złuszczeniem) i rozsiew do innych miejsc. Na rozproszenie biofilmu wpływają między innymi działające na niego siły mechaniczne oraz aktywacja systemu *agr* – konsekwencją tego procesu jest wytworzenie m.in. enzymów degradujących cząsteczki matrix, takich jak nukleazy i proteazy, oraz PSMs. Sugeruje się, że PSMs są produkowane już w fazie dojrzewania biofilmu, a ich

rola w dyspersji polega na rozrywaniu wiązań niekowalencyjnych pomiędzy cząsteczkami matrix (Ryc. 1.5.) [45, 46].



Rycina 1.5. Stadia rozwoju biofilmu (wg Le i wsp. [46], modyfikacja własna).

A – Faza przylegania: bakterie w formie planktonicznej adherują do powierzchni biologicznych za pomocą wiązań niekowalencyjnych pomiędzy białkami matrix gospodarza i bakteryjnymi białkami wiążącymi, np. MSCRAMMs.

B – Dojrzewanie biofilmu: po przyłączeniu komórek do powierzchni bakterie produkują zewnątrzkomórkową matrix biofilmu złożoną głównie z egzopolisacharydów (np. PIA), eDNA i białek. W strukturze biofilmu w wyniku dyspersyjnego działania PSMs tworzą się kanały.

C – Faza dyspersji: łuszczenia; pojedyncze bakterie bądź ich skupiska odrywają się od biofilmu wskutek działania sił mechanicznych oraz aktywności substancji degradujących biofilm (PSMs, nukleazy, proteazy).

Gronkowca złocistego można nazwać drobnoustrojem uniwersalnym, gdyż potrafi dostosować się do otaczających go, zmieniających się warunków środowiska. Jest w stanie kolonizować różne obszary błon śluzowych i skóry, zarówno u człowieka, jak i u wielu gatunków zwierząt. Jako patogen chorobotwórczy potrafi przetrwać w różnych tkankach, także we krwi, może wywołać infekcje miejscowe i układowe. Ta ogromna zdolność do adaptacji wynika przede wszystkim z obecności systemów regulacji genów [47].

Jednym z najlepiej poznanych systemów tego rodzaju jest system globalnej regulacji genów *agr*. Stanowi on typowy dla bakterii Gram-dodatnich system *quorum-sensing*, który koordynuje ekspresję wielu białek, przede wszystkim egzoprotein, odpowiedzialnych za wirulencję. Są one niezbędne w inicjacji procesu chorobotwórczego. Czynnikiem regulującym ekspresję poszczególnych genów jest zmiana gęstości komórek bakteryjnych, zależna od fazy wzrostu drobnoustroju [48, 49].

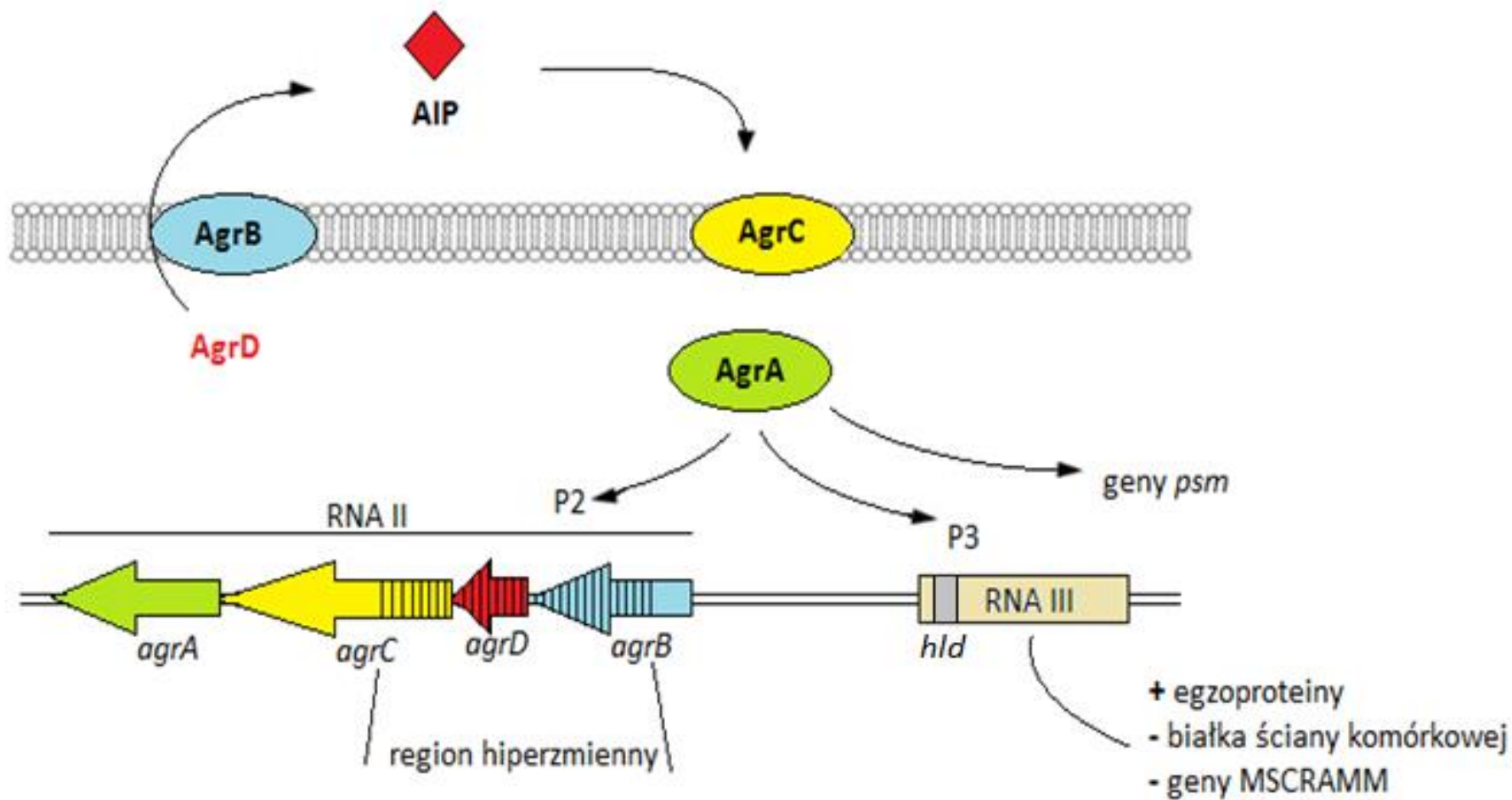
Locus *agr* składa się z pięciu genów: *hld*, *agrB*, *agrD*, *agrC* i *agrA*, kontrolowanych przez promotory P2 i P3. Operon P2 jest odpowiedzialny za syntezę autoinduktora systemu *agr* – AIP (ang. autoinducing peptide). AIP jest małym ośmioaminokwasowym peptydem powstającym w wyniku posttranslacyjnej modyfikacji propeptydu kodowanego przez *agrD*. W modyfikacji tej bierze udział transbłonowe białko AgrB. AIP stanowi ligand dla cząsteczki sygnałowej AgrC [47, 50, 51].

Gen *agrC* koduje transbłonową kinazę histydynową, która jako jedyne białko jest zdolna do wiązania AIP. Potwierdza to rolę receptorową AgrC w systemie *agr*. Aktywne białko AgrC prowadzi do fosforylacji i aktywowania białka efektorowego AgrA, które jest niezbędne w procesie aktywacji promotorów P2 i P3 [47].

Konsekwencją autoindukcji *agr* jest produkcja RNA III stanowiącego transkrypt promotora P3. RNA III jako kolejna cząsteczka efektorowa reguluje transkrypcję wielu istotnych dla wirulencji danego szczepu egzoprotein [47]. Jedynym bezpośrednim produktem translacji RNA III jest hemolizyna delta [52]. Pod kontrolą *agr* znajdują się między innymi PSMs [53], toksyna alfa [19],

toksyny eksfoliatywne, enterotoksyny, PVL, toksyna gamma, TSST-1 [61]. Ponadto sugeruje się, że aktywacja systemu *agr* jest wymagana do pobudzenia aktywności prozapalnej gronkowców. RNA III hamuje równocześnie syntezę białek powierzchniowych, które biorą udział w procesie kolonizacji drobnoustroju [53].

W obrębie locus *agr* stwierdzono znaczny polimorfizm dotyczący genów *agrD* oraz fragmentów genów *agrB* i *agrC*. Na podstawie tej zmienności wyróżnia się obecnie cztery grupy (klasy) specyficzności *agr*: *agr I*, *agr II*, *agr III* i *agr IV* (Ryc. 1.6.). Przynależność szczepu do danej klasy specyficzności *agr* ma związek z jego przynależnością filogenetyczną [52]. Sugeruje się, że istnieje również korelacja między klasą specyficzności *agr*, a rodzajem wytwarzanych toksyn i w konsekwencji z wirulencją szczepu [54].

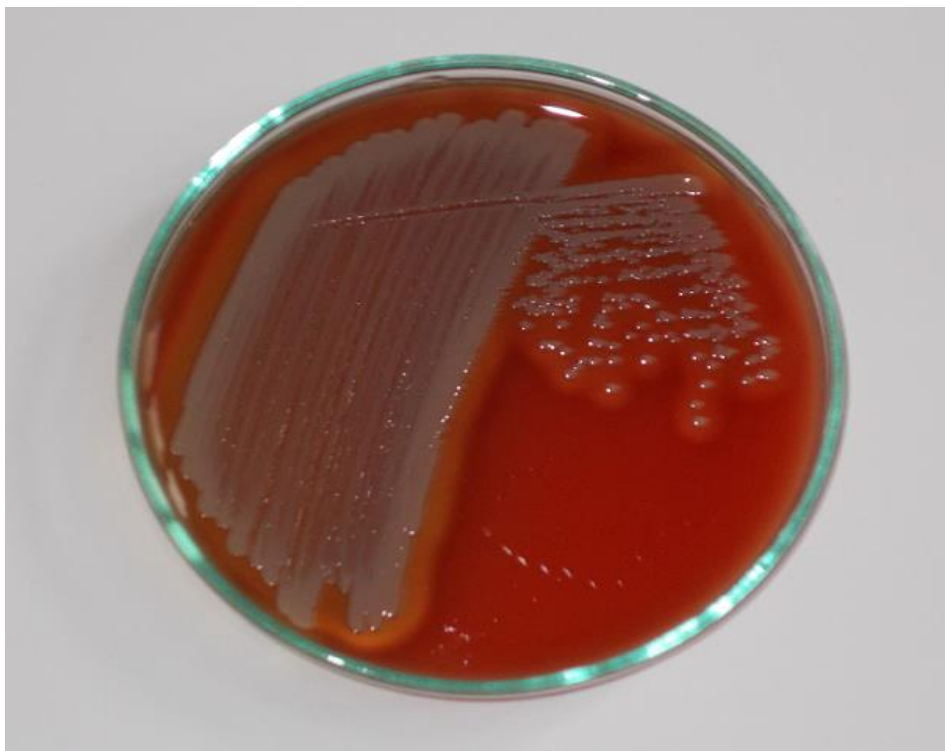


Rycina 1.6. Schemat locus *agr* *S. aureus* i jego mapa funkcjonalna (wg Novic [47] oraz Dufour i wsp. [52], modyfikacja własna).
Opis w tekście

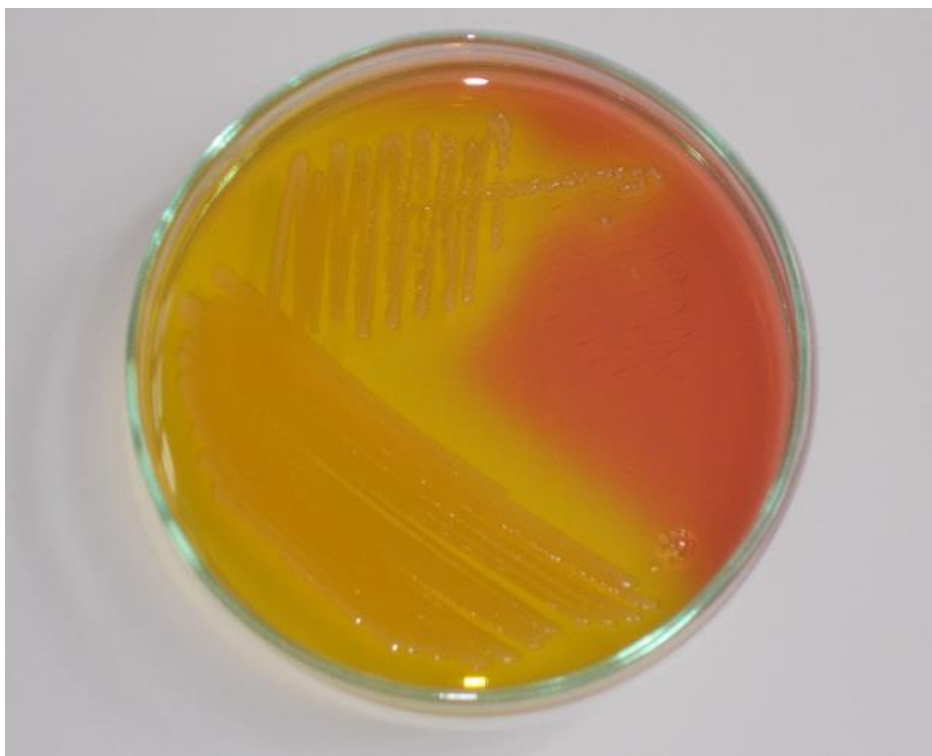
1.1.7. Diagnostyka

Gronkowce złociste rosną dobrze na prostych podłożach bakteriologicznych w warunkach tlenowych. Tworzą dość duże, gładkie, okrągłe kolonie, najczęściej o barwie kremowoszarej do kremowozółtej. Na podłożu agarowym z dodatkiem krwi baraniej większość szczepów otoczonych jest strefą hemolizy beta (Ryc. 1.7.), zazwyczaj lepiej widocznej w hodowli 48-godzinnej [6].

Do izolacji gronkowców wykorzystujemy podłoża wybiórcze: podłoże Chapmana i podłoże Baird-Parkera, które bazują na wysokiej odporności *Staphylococcus* na stres osmotyczny. Stosowane w mikrobiologii klinicznej podłoże Chapmana zawiera w swoim składzie mannitol oraz 7,5 % NaCl. Wysokie stężenie soli hamuje wzrost większości innych drobnoustrojów. *S. aureus* jest zdolny do fermentacji mannitolu, co uwidacznia się poprzez zmianę zabarwienia pożywki z łososioworóżowego na żółte (wskaźnikiem jest czerwień fenolowa)(Ryc. 1.8.) [6].



Rycina 1.7. Hodowla *S. aureus* na podłożu z 5 % krwią baranią z widoczną strefą beta hemolizy [zdjęcie własne].



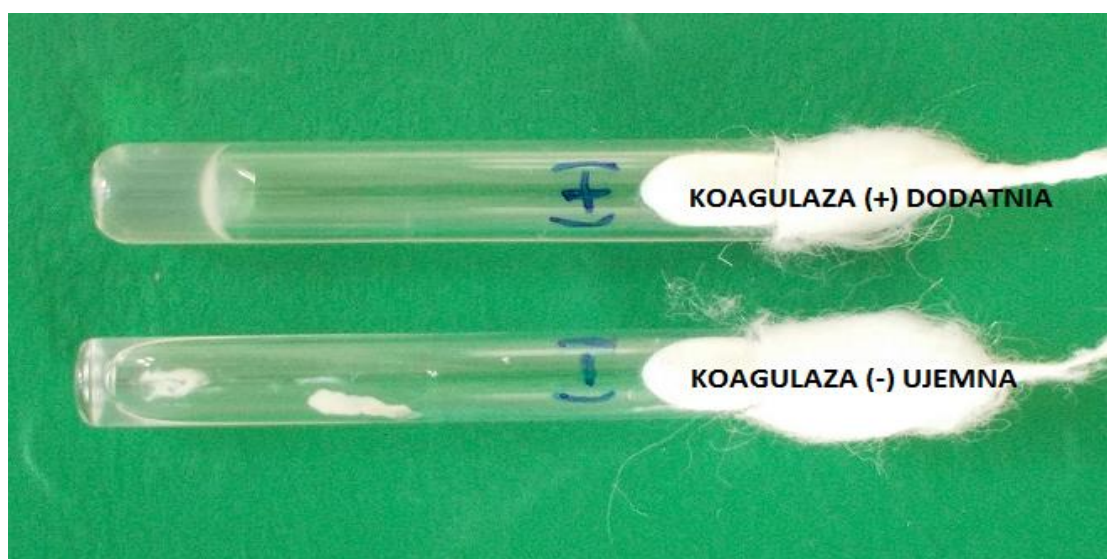
Rycina 1.8. Hodowla *S. aureus* na podłożu wybiórczo-różnicującym Chapmana [zdjęcie własne].

Gronkowce złociste są drobnoustrojami zdolnymi do wytwarzania katalazy. Produkcję tego enzymu sprawdza się w prostym teście: na szkiełko podstawowe nanosi się kroplę 0,9 % NaCl, a następnie zawiesza się w niej kilka kolonii badanego szczepu i dodaje kroplę wody utlenionej. Wydzielające się pęcherzyki gazu świadczą o pozytywnym wyniku testu [6].

Identyfikacja gatunkowa gronkowców złocistych opiera się przede wszystkim na wykazaniu zdolności wytwarzania koagulazy wolnej oraz związanej. Test na obecność koagulazy związanej polega na stwierdzeniu obecności czynnika skupiania (ang. clumping factor A). Jest to powierzchniowy receptor dla fibrynogenu związany ze ścianą komórkową *S. aureus*, który przekształca go w fibrynę bez udziału aktywatora, dlatego reakcja ta daje natychmiastowe wyniki. Próbę na obecność koagulazy związanej przeprowadza się jako test szkiełkowy, w którym w kropli osocza króliczego zawiesza się badany szczep. O pozytywnym wyniku reakcji świadczy pojawienie się w ciągu kilkunastu sekund charakterystycznych strąków [6, 55].

Próbie na obecność koagulazy wolnej wykonuje się testem probówkowym. Kilka kolonii badanego szczepu zawiesza się w osoczu króliczym w buforze cytrynianowym. Wytrącenie się skrzepu w ciągu 1, 3, 6 lub 24 godzin świadczy o pozytywnym, dodatnim, wyniku reakcji i jest charakterystyczne tylko dla *S. aureus* oraz kilku gatunków *Staphylococcus* występujących u zwierząt (Ryc. 1.9.) [6, 55].

Ważne miejsce w identyfikacji gatunkowej zajmują komercyjne testy biochemiczne, np. półautomatyczne ApiSTAPH (bioMérieux) czy STAPHYtest 24 (Erba Lachema). W diagnostyce gronkowców złocistych można zastosować również metody biologii molekularnej, takie jak gatunkowo-specyficzny PCR (polimerazowa reakcja łańcuchowa, ang. polymerase chain reaction). Wykorzystuje się je przede wszystkim w badaniach epidemiologicznych [7].



Rycina 1.9. Próba na koagulazę wolną, metoda probówkowa [zdjęcie własne].

1.1.8. Leczenie

Gronkowce złociste naturalnie wykazywały wrażliwość na większość antybiotyków wprowadzanych do leczenia na przestrzeni lat. Posiadają jednak zdolność do szybkiego nabywania oporności na antybiotyki, najczęściej na drodze horyzontalnego transferu genów i mutacji chromosomalnych. Już kilka lat po wprowadzeniu do leczenia penicyliny,

odkrytej przez Aleksandra Fleminga, szczepy penicyliinooporne *S. aureus* zaczęły stanowić poważny problem terapeutyczny [56].

Obecnie wyróżniamy u gronkowców złocistych dwa mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe:

- produkcja β -laktamaz, enzymów hydrolizujących penicyliny naturalne, aminopenicyliny i ureidopenicyliny. β -laktamazy są kodowane na plazmidach (szacuje się, że posiada je 80 – 90 % szczepów *S. aureus*);
- mutacja w genie *mecA*, znajdującym się na chromosomie w rejonie zwanym *SCCmec* (gronkowcowa kaseta chromosomalna *mec*, ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*), skutkująca produkcją zmienionych białek PBP2', które nie wykazują powinowactwa do antybiotyków β -laktamowych. Szczepy takie charakteryzują się opornością na wszystkie antybiotyki β -laktamowe i określamy je mianem szczepów metycyliinoopornych (ang. methicillin resistant *S. aureus*, MRSA) [57]. Odnotowano już jednak metycyliinooporne szczepy *S. aureus* z mutacją w genie *mecC* [58].

W leczeniu zakażeń wywołanych przez metycylinowrażliwe szczepy *S. aureus* (ang. methicillin sensitive *S. aureus*, MSSA) można zastosować antybiotyki β -laktamowe, takie jak penicyliny przeciwgronkowcowe, penicyliny izoksazolilowe, penicyliny z inhibitorami β -laktamaz, cefalosporyny I i II generacji. Skuteczność wykazują również antybiotyki innych grup: makrolidy, linkozamidy, trimetoprim/ sulfametoksazol, tetracykliny, fluorochinolony czy aminoglikozydy [57].

Pojawienie się szczepów MRSA odnotowano już w latach 60' ubiegłego wieku, kilka lat po wprowadzeniu do lecznictwa metycyliny. Szczepy te bardzo szybko rozprzestrzeniły się na świecie. Obecnie wyróżnia się zakażenia wywołane przez szczepy MRSA związane ze środowiskiem szpitalnym (ang. hospital-acquired MRSA, HA-MRSA) izolowane przede wszystkim od pacjentów szpitalnych oraz CA-MRSA, izolowane z zakażeń pozaszpitalnych [59]. Szczepy MRSA są z definicji oporne na działanie wszystkich antybiotyków z grupy β -laktamów, nawet na karbapenemy. Jednak szczepy szpitalne i środowiskowe znacznie różnią się wrażliwością na pozostałe grupy antybiotyków. Izolaty CA-MRSA charakteryzują się opornością na makrolidy i/lub tetracykliny. Z kolei szczepy HA-MRSA

są wielolekooporne, często nie wykazują wrażliwości na tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy, trimetoprim/ sulfametoksazol czy fluorochinolony [57, 60].

Aktywność wobec szczepów MRSA wykazują leki glikopeptydowe (wankomycyna i teikoplanina), linezolid, daptomycyna oraz tigecyklina [60]. Pojawiły się jednak szczepy VRSA wykazujące oporność na antybiotyki glikopeptydowe. W Polsce sporadycznie odnotowuje się szczepy wykazujące obniżoną wrażliwość na tę grupę leków, tzw. szczepy *S. aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (ang. vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) [57, 61].

Obecnie nie zaleca się eradykacji bezobjawowego nosicielstwa gronkowca złocistego za pomocą antybiotyków, zwłaszcza gdy jest to szczep MSSA. W uzasadnionych przypadkach stosuje się mupirocynę w celu likwidacji nosicielstwa szczepów MRSA z przedślonki nosa [57].

1.2. *Chlamydia pneumoniae*

1.2.1. Charakterystyka rodzaju *Chlamydia*

Chlamydie to małe, atypowe drobnoustroje przypominające kształtem ziarniaki, o rozmiarach 0,2 – 1,5 μm . Pod względem budowy ściany komórkowej zbliżone są do bakterii Gram ujemnych, nie posiadają warstwy peptydoglikanu. W ścianie komórkowej znajduje się lipopolisacharyd (chlamydial lipopolisacharide, cLPS) o bardzo niskiej toksyczności. Jest on wspólny dla wszystkich bakterii z rodzaju *Chlamydia* i stanowi jednocześnie antygen grupowo-swoisty. U *C. pneumoniae* możemy również wyróżnić antygen gatunkowo-swoisty: białka błony zewnętrznej (ang. outer membrane protien, omp). Omp-1 i omp-2 to białka bogate w cysteinę, wrażliwe na działanie czynników chemicznych i fizycznych [4].

Chlamydia sp. są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi, większość niezbędnych do rozwoju substratów, np. cholesterol, sfingomielinę

czy sfingolipidy [62], pobierają z komórki gospodarza. Nie są również zdolne do samodzielnej syntezy ATP, stąd chlamydie nazywa się też pasożytami energetycznymi [63].

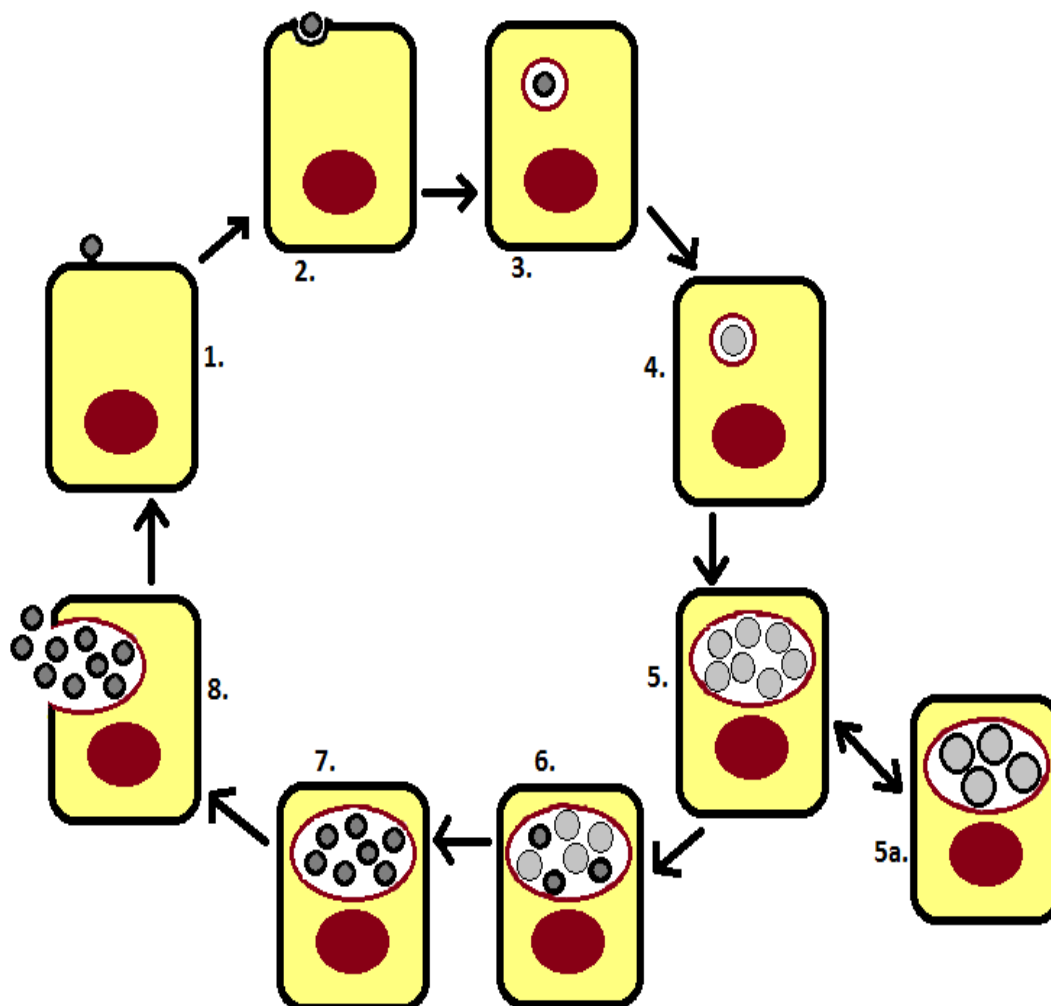
Cykl rozwojowy

Cechą charakterystyczną wszystkich bakterii z rodzaju *Chlamydia* jest unikatowy cykl rozwojowy (Ryc. 1.10.). Pierwszy etap tego cyklu stanowi adherencja i internalizacja ciała elementarnego (ang. elementary body, EB) do komórki nabłonka gospodarza. EB są cząstkami zakaźnymi odpornymi na niekorzystne warunki środowiskowe panujące poza komórką gospodarza. EB nie wykazują aktywności metabolicznej i nie są zdolne do rozmnażania [70]. Sugeruje się, że za udział w adhezji do komórek ludzkich jest odpowiedzialne białko omcB (ang. outer membrane complex B), a receptorem dla niego są glikozaminoglikany [64]. EB wnika na drodze endocytozy do komórki gospodarza, gdzie przebywa w fagosomie, który nie ulega fuzji z lizosomem (tworząc inkluzję) [65]. Po 6 – 8 godzinach ulega transformacji do ciała siateczkowatego (ang. reticulate body, RB). RB stanowi aktywną metabolicznie formę zdolną do rozmnażania, ale niezdolną do przeżycia poza komórką gospodarza. RB jest większe od EB i nie posiada nukleoidu. RB pozostając w wakuolach dzieli się wielokrotnie poprzez podział podwójny przez 18 do 24 godzin. Wakuole widoczne w obrazie mikroskopowym zawierające RB nazywane są wtrętami komórkowymi. Kolejną fazą cyklu życiowego *Chlamydia*, trwającą ok. 6 godzin, jest transformacja RB do EB, następująca wskutek zagęszczenia RB i wzmożonej syntezy białek błony zewnętrznej. Ostatni etap polega na uwolnieniu nowych EB na drodze endocytozy lub poprzez lizę komórek gospodarza. Uwolnione ciała elementarne są zdolne do zakażenia następnych komórek. Szacuje się, że cały cykl rozwojowy może trwać do 48 – 72 godzin [4].

Dowiedziono, że istnieje również możliwość przekształcenia EB znajdującego się w fagosomie w ciało przetrwałe (ang. persistent body PB). Sugeruje się, że czynnikiem wyzwalającym powstanie PB jest odpowiedź immunologiczna ze strony gospodarza [66]. PB mogą przez długi czas

pozostawać w uśpieniu w komórkach gospodarza i są odpowiedzialne za rozwój zakażeń przewlekłych [5].

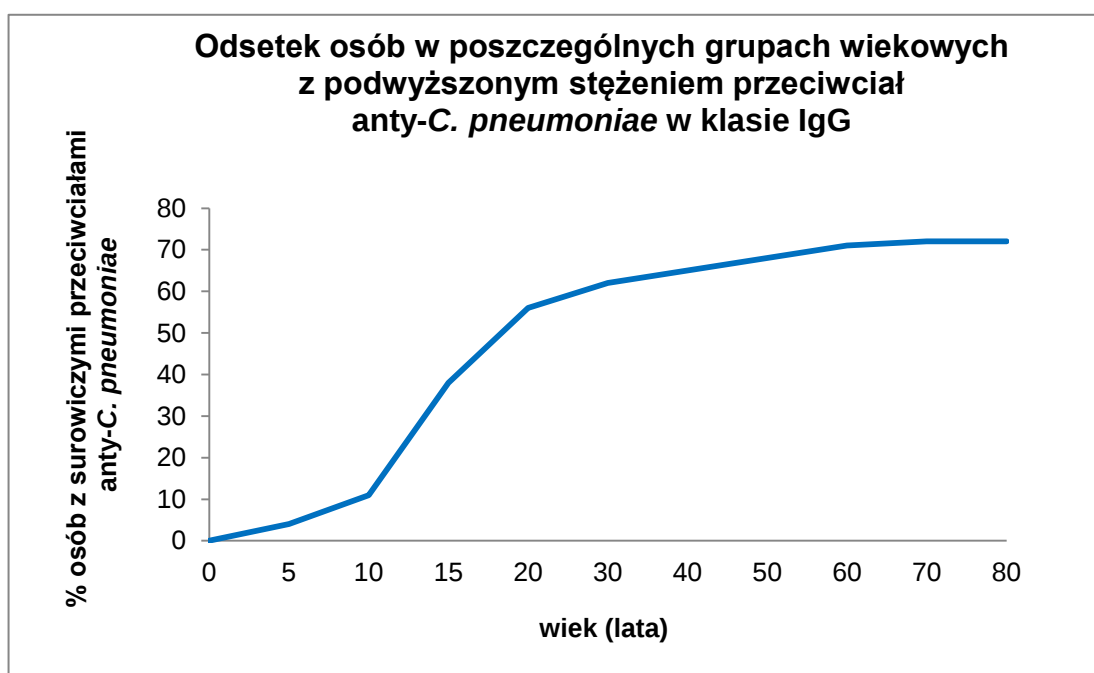
C. pneumoniae są zdolne do namnażania się w różnych komórkach gospodarza, np. w komórkach nabłonka oddechowego, w makrofagach, w komórkach endotelium naczyń krwionośnych, w komórkach mięśni gładkich, [5] czy w komórkach nerwowych. Drobnoustroje te prowadzą do zahamowania apoptozy zainfekowanej komórki poprzez niszczenie białek proapoptotycznych oraz do hamowania aktywności MHC I i MHC II [62, 67, 68].



Rycina 1.10. Cykl rozwojowy *Chlamydia pneumoniae* (wg Jama-Kmiecik i wsp. [4] oraz Continii wsp. [66], modyfikacja własna).

1. Adherencja EB. 2. Endocytoza EB. 3. Utworzenie fagosomu zawierającego EB. 4. Przekształcenie EB w RB. 5. Fagosom zawierający RB. 5a. Przekształcenie RB w PB oraz PB w RB. 6. Przekształcenie RB w EB. 7. Fagosom zawierający EB 8. Uwolnienie EB.

Zakażenia o etiologii *C. pneumoniae* mają zasięg ogólnosiwiatowy, spotykamy je w każdym klimacie, jednak szczególne często występują w krajach rozwiniętych, z klimatem ciepłym i umiarkowanym. Nie cechują się sezonowością. Występują w każdej grupie wiekowej, a ryzyko kontaktu z patogenem wzrasta z wiekiem. Najczęściej dochodzi do zakażenia w wieku młodzieńczym, dlatego też w tym przedziale wiekowym obserwuje się najbardziej dynamiczny wzrost stężenia przeciwciał anti- *C. pneumoniae* w surowicy krwi [69]. Szacuje się, że około 1 – 4 % populacji jest nosicielami tego drobnoustroju [70, 71], a blisko 70 % dorosłej populacji ma podwyższone miano przeciwciał w klasie IgG, co świadczy o przebyciu infekcji *C. pneumoniae* (Ryc. 1.11.) [69].



Rycina 1.11. Szacunkowy odsetek osób z podwyższonym stężeniem przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi, w poszczególnych grupach wiekowych (wg Contini i wsp. [66] oraz Kuo i wsp. [69], modyfikacja własna).

Ze względu na wysokie powinowactwo do nabłonka dróg oddechowych infekcje dotyczą przede wszystkim układu oddechowego [72, 73]. Transmisja drobnoustroju odbywa się drogą kropelkową, człowiek stanowi jedyny rezerwuuar tego patogenu. Formą zakaźną jest wspomniane wcześniej

EB. Zakażenia rozwijają się powoli, okres wylegania trwa kilka tygodni. Sugeruje się, że okres zakażenia wśród członków rodziny jest krótszy i wynosi 5 do 18 dni [66]. Uważa się, że zakażenia mogą występować zarówno endemicznie jak i epidemicznie – szczególnie w środowiskach zamkniętych i w dużych skupiskach ludzi [4, 74].

1.2.3. Chorobotwórczość *C. pneumoniae* i potencjalne powikłania zakażeń

C. pneumoniae może być czynnikiem etiologicznym pozaszpitalnego zapalenia płuc (szacuje się, że blisko 10 % wszystkich przypadków [75]), zapalenia oskrzeli, zapalenia gardła, zapalenia krtani oraz zapalenia zatok. Może też przyczynić się do zaostrzenia przewlekłego zapalenia oskrzeli czy astmy [5]. Szacuje się, że ok. 70 % tych infekcji przebiega bezobjawowo bądź skąpoobjawowo. Ze względu na subkliniczny charakter zakażeń są one trudne w diagnostyce [5, 72]. Chlamydiowe atypowe zapalenie płuc często ma postać łagodnej, samoograniczającej się infekcji. Postać ciężką spotyka się przede wszystkim u osób starszych, wyniszczonych i z obniżoną odpornością oraz osób ze współistniejącą chorobą serca [76, 77]. W wyniku przebycia zakażenia *C. pneumoniae* człowiek nie nabywa trwałej odporności, dlatego też możliwe są reinfekcje tym patogenem [72].

Dowodzono, że przewlekłe zakażenia wywołane przez *C. pneumoniae* mogą przyczynić się do rozwoju wielu poważnych schorzeń przewlekłych. Antygeny lub materiał genetyczny tego drobnoustroju wykryto między innymi w płycie miazdźcowej [78], w płynie mózgowo-rdzeniowym czy tkance mózgowej osób z chorobami neurodegeneracyjnymi [67, 76]. Ponadto, chroniczny stan zapalny indukowany przez *C. pneumoniae* może przyczynić się do rozwoju astmy czy przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) [76].

Astma

Pierwsze doniesienia o związku pomiędzy występowaniem ostrej infekcji o etiologii *C. pneumoniae* i astmy pojawiły się na początku lat 90' ubiegłego wieku. Udowodniono, że pacjenci z objawami astmy, zarówno ci, u których zdiagnozowano chorobę po raz pierwszy, jak i ci z kolejnymi atakami, mają

istotnie podwyższone miano przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG i IgA [79]. Sugeruje się, że patomechanizm tego procesu polega na stymulacji silnej odpowiedzi zapalnej gospodarza, między innymi przez białka szoku termicznego (ang. heat shock protein, hsp) produkowane przez *C. pneumoniae*. Przeważa odpowiedź cytokinowa ze strony limfocytów Th2. Dodatkowo drobnoustroj uszkodza funkcje nabłonka rzęskowego [4]. Procesy te prowadzą do remodelingu ścian dróg oddechowych [76].

Przewlekła obturacyjna choroba płuc

Również w przypadku POChP stwierdzono związek z przetrwałym zakażeniem *C. pneumoniae*. U pacjentów wykazano wzrost miana przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgA [4]. Podobnie jak w patogenezie astmy, drobnoustroj ten przyczynia się do uszkodzenia nabłonka rzęskowego oraz do nasilenia przewlekłego stanu zapalnego wywołanego produkcją cytokin prozapalnych [76].

Miażdżyca i choroba niedokrwienna serca

C. pneumoniae może być też jednym z czynników stymulujących proces aterogenezy. Chlamydie z układu oddechowego, który jest pierwotnym miejscem infekcji tym patogenem, przedostają się do tkanki limfatycznej w płucach, gdzie mogą zostać wychwycone przez monocyty krwi obwodowej. Wewnątrz monocytów *C. pneumoniae* są transportowane po całym organizmie. Zainfekowane monocyty ulegają proliferacji [80], mogą przylegać do komórek endotelium naczyń i infekować kolejne komórki. Zakażone komórki naczyń krwionośnych produkują chemokiny oraz liczne białka prozapalne. Sugeruje się, że cLPS stymuluje powstawanie komórek piankowatych, a hsp60 bierze udział w oksydacji lipoprotein i aktywacji molekuł adhezyjnych przyczyniających się do tworzenia płytki miażdżycowej. U pacjentów z chorobą wieńcową stwierdzono podwyższone stężenie przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w surowicy krwi, a w płytce miażdżycowej wykazano obecność DNA tych drobnoustrojów [78, 81].

Choroby neurodegeneracyjne

Również w chorobie Alzheimera (ang. Alzheimer's disease, AD) wykazano związek z przetrwałym zakażeniem wywołanym przez *C. pneumoniae*. Drobnoustroj ten wykazuje powinowactwo do komórek endotelium, astrogleju, mikrogleju oraz neuronów. W badaniach immunohistochemicznych mózgów osób z AD o późnym początku dowiedziano wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej obecności antygenów chlamydii w hipokampie i korze śródwęchowej. W korze czołowej i skroniowej wykazano zarówno antygeny *C. pneumoniae*, jak i złogi amyloidu. Rola *C. pneumoniae* w patomechanizmie AD nie jest jeszcze dokładnie zbadana [66, 67].

U pacjentów cierpiących na stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis, MS) stwierdzono podwyższone miano przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w klasie IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym. Sugeruje się, że rola chlamydii w tym procesie polega głównie na stymulacji procesów zapalnych w OUN, te z kolei prowadzą do postępującej demielinizacji. Jednak związek z patogenezą MS pozostaje nadal bardzo kontrowersyjny [66, 82].

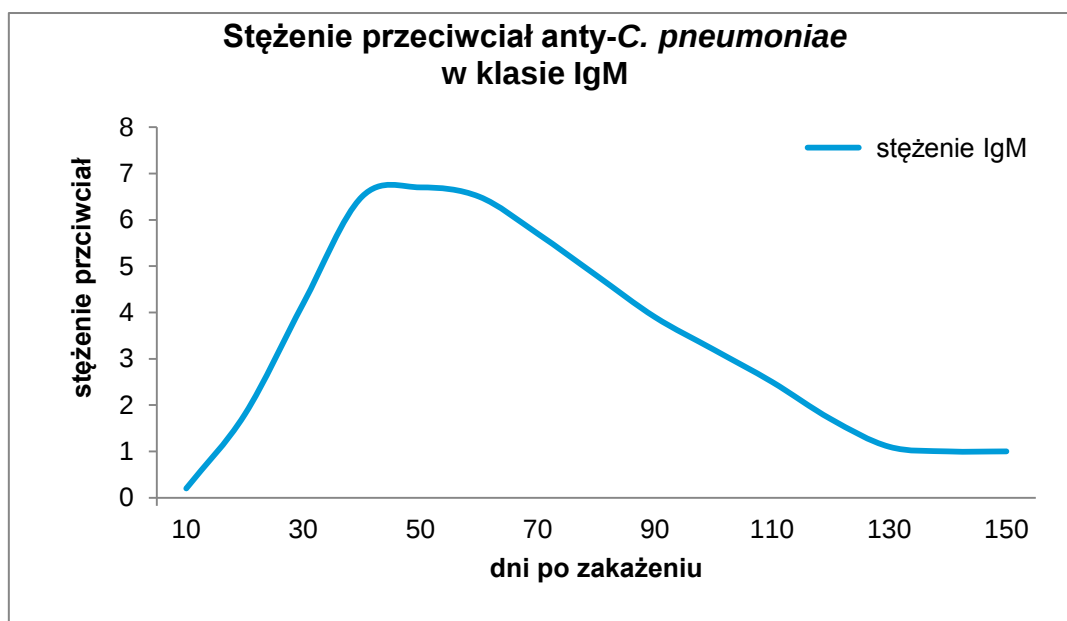
1.2.4. Diagnostyka zakażeń *C. pneumoniae*

Diagnostyka zakażeń wywołanych przez *C. pneumoniae* rutynowo opiera się przede wszystkim na badaniach serologicznych oraz wykrywaniu materiału genetycznego drobnoustroju (PCR). Jednak czułości i swoistości dostępnych testów różnią się znacznie między sobą, a na wyniki prób ma wpływ wiele czynników związanych głównie z pobraniem i przygotowaniem materiału do badań. Dlatego też diagnostyka zakażeń *C. pneumoniae* jest dość trudna, a wyniki wymagają dokładnej i wnikliwej interpretacji w oparciu o stan kliniczny pacjenta [73].

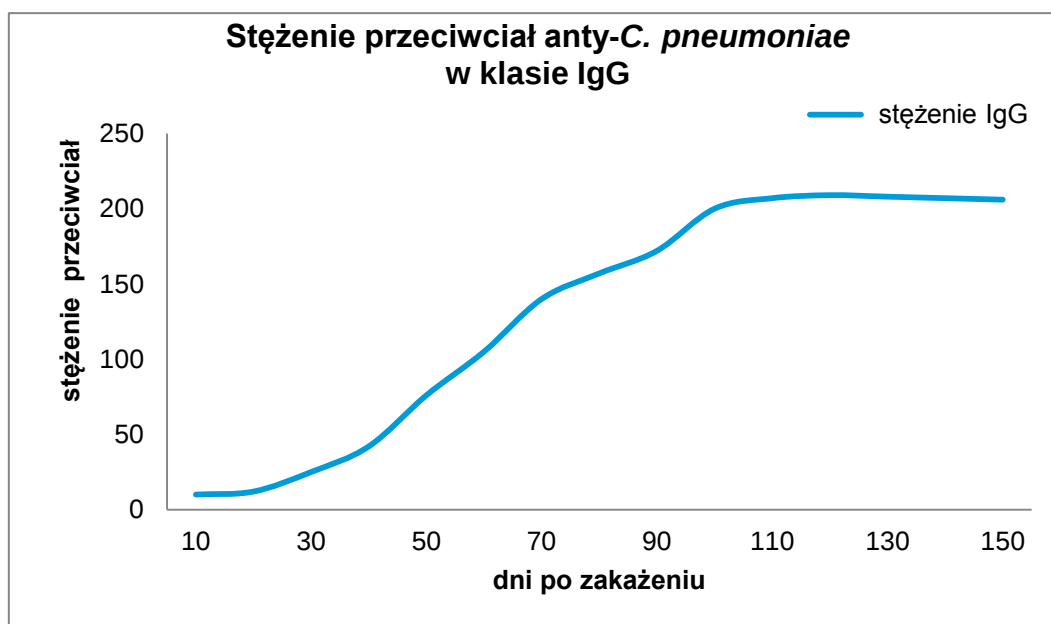
Diagnostyka serologiczna

Serologia zajmuje istotne miejsce w diagnostyce zakażeń o etiologii *C. pneumoniae*, jest najczęściej wykorzystywaną metodą. Pozwala na dość dokładną analizę infekcji, jednak wyniki często nie korelują z obecnością drobnoustroju w organizmie. Materiał diagnostyczny stanowi surowica

pacjenta. Prawidłowa ocena mian przeciwciał w klasach IgG, IgM czy IgA pozwala na określenie czy badany ma infekcję ostrą czy przewlekłą. Podwyższone stężenie przeciwciał w klasie IgM świadczy o świeżym, pierwotnym zakażeniu. Pojawiają się one w surowicy krwi około 2 – 3 tygodnie po zakażeniu i zanikają po 2 do 6 miesiącach (Ryc. 1.12.). Przeciwciała w klasie IgG, jako wskaźniki przebytej infekcji, osiągają najwyższe stężenie około 6 tygodni po zakażeniu. Okres półtrwania tych przeciwciał wynosi kilka miesięcy (Ryc. 1.13.). W przypadku reinfekcji dochodzi do szybkiego wzrostu miana przeciwciał w klasie IgG bez wzrostu w klasie IgM [83]. Badania dowodzą, że podwyższone stężenie przeciwciał w klasie IgA jest spowodowany infekcją przewlekłą bądź przetrwałą [84].



Rycina 1.12. Dynamika narastania stężenia przeciwciał przeciwko *C. pneumoniae* w klasie IgM w surowicy krwi w czasie (wg Miyashita i wsp. [85], modyfikacja własna).



Rycina 1.13. Dynamika narastania stężenia przeciwciał przeciwko *C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi w czasie (wg Miyashita i wsp. [85], modyfikacja własna).

W badaniu miana specyficznych przeciwciał anty-*C. pneumoniae* klasach IgG, IgM czy IgA można zastosować mikroimmunofluorescencję (MIF) lub metody immunoenzymatyczne (ang. enzyme-linked immuno-adsorbent assay, ELISA). Testy te jednak, do postawienia dokładnej diagnozy, wymagają dwukrotnego badania, tzw. parą surowic [6, 73]. Z powodu wymaganego 4 – 8 tygodniowego odstępu między pobraniami krwi badania te służą z reguły jako diagnostyka retrospektywna [86].

Według zaleceń Centrów Kontroli i Prewencji Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) testy MIF, ze względu na wysoką specyficzność, stanowią metodę referencyjną w serodiagnostyce. Aby stwierdzić ostre zakażenie o etiologii *C. pneumoniae* należy stwierdzić w pojedynczym badaniu miano przeciwciał w klasie IgM powyżej 1:16 lub czterokrotny wzrost stężenia przeciwciał w klasie IgG w podwójnym badaniu [83].

Metody biologii molekularnej

Obecnie dostępne są gotowe, komercyjne zestawy PCR do diagnostyki *C. pneumoniae*. Różnią się zarówno rodzajem metody (PCR monoplex

lub multiplex) jak i poszukiwanym fragmentem genu (16S rRNA, *ompA*, *PstI*, *PmP4*), a także sposobem amplifikacji materiału genetycznego (konwencjonalny, nested-PCR, real-time PCR). W diagnostyce molekularnej istotny jest dobór odpowiedniego materiału do badania (przy infekcjach dróg oddechowych wskazany jest wymaz z gardła) oraz izolacja kwasu nukleinowego [6, 73].

Zaletą metody PCR jest jej wysoka specyficzność oraz możliwość uzyskania wyniku jeszcze przed serokonwersją. Charakteryzuje się jednak mniejszą czułością niż metody serologiczne [87], a sama obecność DNA drobnoustroju nie świadczy o aktywnym zakażeniu ani o jego fazie [88].

Hodowla

Drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* to bezwzględne patogeny wewnątrzkomórkowe, dlatego też nie namnażają się na sztucznych podłożach. Można je hodować jedynie na liniach komórkowych. Dla gatunku *C. pneumoniae* najbardziej odpowiednie są linie HeLa i Hep-2. Hodowla tkankowa pozwala na ocenę morfologii poszczególnych form rozwojowych chlamydii dzięki zastosowaniu odpowiednich barwień czy immunofluorescencji. Cechą charakterystyczną *C. pneumoniae* są duże EB, przypominające kształtem gruszkę oraz liczne, drobne inkluzje zlokalizowane wokół jądra komórkowego [6].

1.2.5. Leczenie

Ponieważ chlamydie są drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi w leczeniu stosuje się antybiotyki, które osiągają wysokie stężenia wewnątrz komórek. Patogeny te wykazują wrażliwość przede wszystkim na makrolidy, tetracykliny i fluorochinolony [86].

Makrolidy i tetracykliny charakteryzują się bardzo dobrą aktywnością *in vitro*, dlatego też są najczęściej wykorzystywane w terapii zakażeń chlamydiami. Badania wskazują, że najwyższą aktywność wykazują klarytromycyna i azytromycyna. Makrolidy są lekiem pierwszego rzutu w leczeniu zakażeń o etiologii *C. pneumoniae* zarówno u dzieci, jak

i dorosłych. Dobrą aktywnością cechują się również chinolony i fluoro-chinolony. Najskuteczniejsze są lewofloksacyna oraz moksifloksacyna [86, 89].

Eradykacja *C. pneumoniae* polega na długotrwałej antybiotykoterapii – 3 do 4 tygodni. Leczenie zakażeń przewlekłych jest dużo trudniejsze, trwa nawet ponad 6 tygodni. Niestety brak jednoznacznych dowodów wskazujących na skuteczność antybiotykoterapii zakażeń chronicznych [76]. Niektóre doniesienia wskazują również na zasadność zastosowania makrolidów w leczeniu astmy [90].

2. Cele pracy

S. aureus i *C. pneumoniae* są mikroorganizmami o zasięgu ogólnościowym. Mogą bezobjawowo kolonizować nabłonek górnych dróg oddechowych człowieka. Gronkowiec złocisty to drobnoustroj powszechnie spotykany w środowisku. Może być przyczyną zarówno zakażeń szpitalnych, jak i pozaszpitalnych, szczególnie niebezpiecznych, gdy są wywołane przez szczepy wielolekooporne. *C. pneumoniae* z kolei jest czynnikiem etiologicznym zakażeń najczęściej o łagodnym, subklinicznym przebiegu, ale ze względu na unikatowy cykl rozwojowy może wywoływać infekcje o charakterze przetrwałym, które skutkują rozwojem chorób przewlekłych, często o podłożu autoimmunologicznym. Rozważając potencjalne konsekwencje i powikłania zakażeń tymi drobnoustrojami ważna jest ocena stopnia ich nosicielstwa.

Głównym celem niniejszej pracy jest określenie występowania nosicielstwa w jamie nosowo-gardłowej dwóch drobnoustrojów istotnych z klinicznego punktu widzenia: *S. aureus* oraz *C. pneumoniae*, w grupie zdrowych, dorosłych osób.

Cele szczegółowe:

1. Dokonanie oceny częstości występowania nosicielstwa *S. aureus* u zdrowych, dorosłych osób.
2. Ocena lekowrażliwości szczepów *S. aureus* izolowanych od zdrowych, dorosłych osób.
3. Ocena występowania grup specyficzności genów regulatorowych *agr* u szczepów *S. aureus* izolowanych od zdrowych, dorosłych osób.
4. Dokonanie oceny częstości występowania nosicielstwa *C. pneumoniae* u zdrowych, dorosłych osób.
5. Dokonanie oceny występowania przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w surowicy krwi u zdrowych, dorosłych osób.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

3.1.1. Dobór pacjentów

Pobieranie materiału, jego przygotowanie i diagnostyka zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wszystkie badania laboratoryjne zostały wykonane samodzielnie przez autorkę pracy. Protokół badawczy został zrecenzowany i zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 146/14 – Załącznik nr 1.).

Materiał do badań zbierano od lutego 2014 roku do września 2015 roku. Grupę badaną stanowiła grupa 264 zdrowych, dorosłych osób w wieku 19 – 24 lata (średnia wieku 21,2 lata), w tym 143 kobiety (54,2 %) i 121 mężczyzn (45,8 %). Zdecydowaną większość badanych stanowili studenci poznańskich uczelni. Żaden z ochotników nie był pracownikiem służby zdrowia. W momencie badania żaden z pacjentów nie zgłaszał objawów chorobowych dotyczących górnych bądź dolnych dróg oddechowych, nie był w trakcie antybiotykoterapii ani nie przyjmował antybiotyków przez ostatnie dwa tygodnie przed pobraniem materiału. Badanie stomatologiczne pozwoliło wykluczyć osoby z potencjalnymi ogniskami infekcji w jamie ustnej. Badanie stomatologiczne zostało wykonane przez lekarza stomatologa dr. hab. Tomasza Karpińskiego. Do doświadczeń nie zaklasyfikowano również osób podających w wywiadzie choroby przewlekłe oraz choroby genetyczne, z wadami anatomicznymi nosa, palaczy, osób stosujących doustną antykoncepcję i przyjmujących doustnie leki, narkotyki.

W celu oceny stopnia nosicielstwa *S. aureus* pobierano od ochotników jałową, bawełnianą wymazówką wymaz z przedsionka jamy nosowej dwukrotnie w odstępie 2 do 3 miesięcy [91]. Od wszystkich badanych pobierano jednokrotnie wymaz z tylnej ściany gardła (wymazówką z dakronu) w celu stwierdzenia obecności *C. pneumoniae*. Od 92 ochotników spośród

badanych 264 osób, w tym 54 kobiet (58,7%) i 36 mężczyzn (41,3 %), pobrano również ok. 10 ml krwi żyłnej na skrzep, w celu oceny miana przeciwciał anty-*C. pneumoniae*. Oceny obecności DNA *C. pneumoniae* i przeciwciał anty-*C. pneumoniae* dokonano u tych samych pacjentów.

3.1.2. Izolaty *S. aureus*

Szczepy *S. aureus* uzyskano dzięki hodowli drobnoustrojów z wymazów z przedsionka jamy nosowej. W poniższych analizach wykorzystano tylko szczepy *S. aureus* pochodzące od nosicieli stałych, tj. szczepy o tej samej lekowrażliwości wyizolowane od tego samego pacjenta w dwukrotnym badaniu. Wszystkie analizowane szczepy zostały zachowane w hodowlach na skosach agarowych.

3.1.3. Materiał genetyczny

Do diagnostyki molekularnej w celu identyfikacji gatunkowej *S. aureus* oraz w kierunku oceny występowania grup specyficzności genów regulatorowych *agr* wykorzystano DNA wyizolowany z uzyskanych izolatów *S. aureus*.

Do diagnostyki molekularnej w kierunku wykrycia nosicielstwa *C. pneumoniae* wykorzystano DNA wyizolowany z wymazów z tylnej ściany gardła.

Wyizolowany materiał genetyczny przed wykonaniem badań molekularnych przechowywano zamrożony w temperaturze -20°C.

3.1.4. Surowica

Surowice do oznaczania stężenia przeciwciał anty-*C. pneumoniae* uzyskano poprzez odwirowanie krwi żyłnej pobranej na skrzep (warunki wirowania: 5 minut, 1 000 RPM). Materiał przed poddaniem dalszej diagnostyce przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2. Metody badawcze

3.2.1. Hodowla, identyfikacja i oznaczenie lekowrażliwości *S. aureus*

3.2.1.1. Hodowla *S. aureus*

Wymazy z przedsionka nosa pobierano jednorazowymi, sterylnymi wymazówkami i niezwłocznie po pobraniu zakładano hodowlę na podłożu agarowym z dodatkiem 5 % krwi baraniej. Hodowle prowadzono w następujących warunkach:

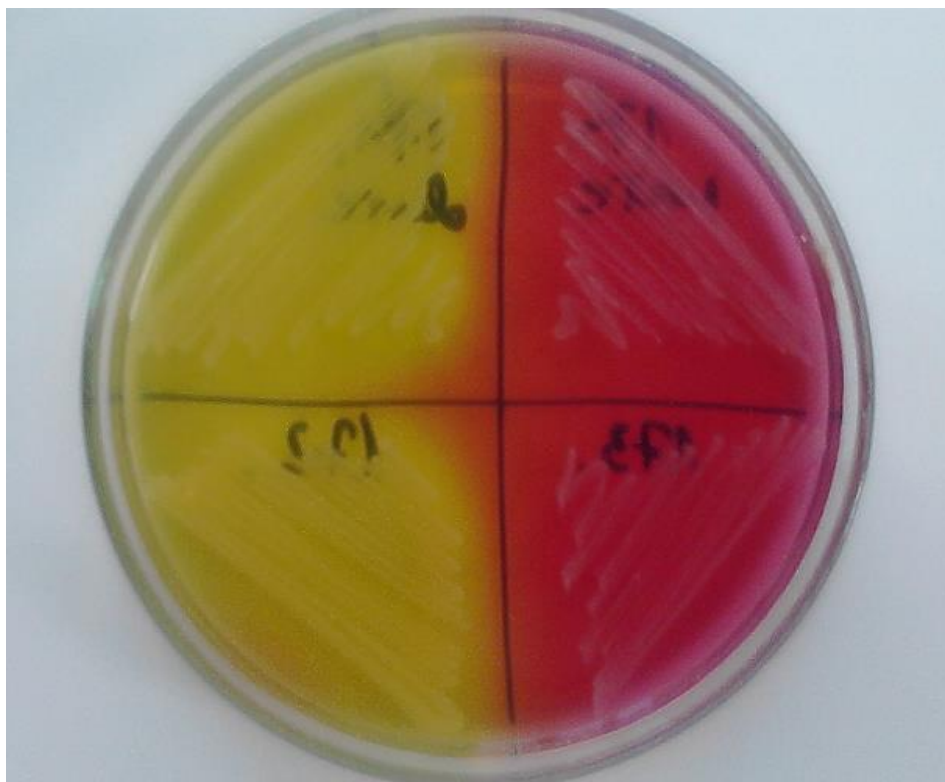
- Temperatura: 37°C,
- Czas: 18 – 24 godz.,
- Atmosfera tlenowa.

W przypadkach, gdy po dobie inkubacji posiewy były jałowe, hodowle prowadzono kolejne 18 – 24 godz.

Po określonym czasie inkubacji dokonywano odczytu. Wyroste na podłożu agarowym z dodatkiem 5 % krwi baraniej kolonie ziarniaków Gram-dodatnich przesiewano na podłoże Chapmana (Ryc. 3.1.).

Hodowle na podłożu Chapmana prowadzono w następujących warunkach:

- Temperatura: 37°C,
- Czas: 18 – 24 godz.,
- Atmosfera tlenowa.

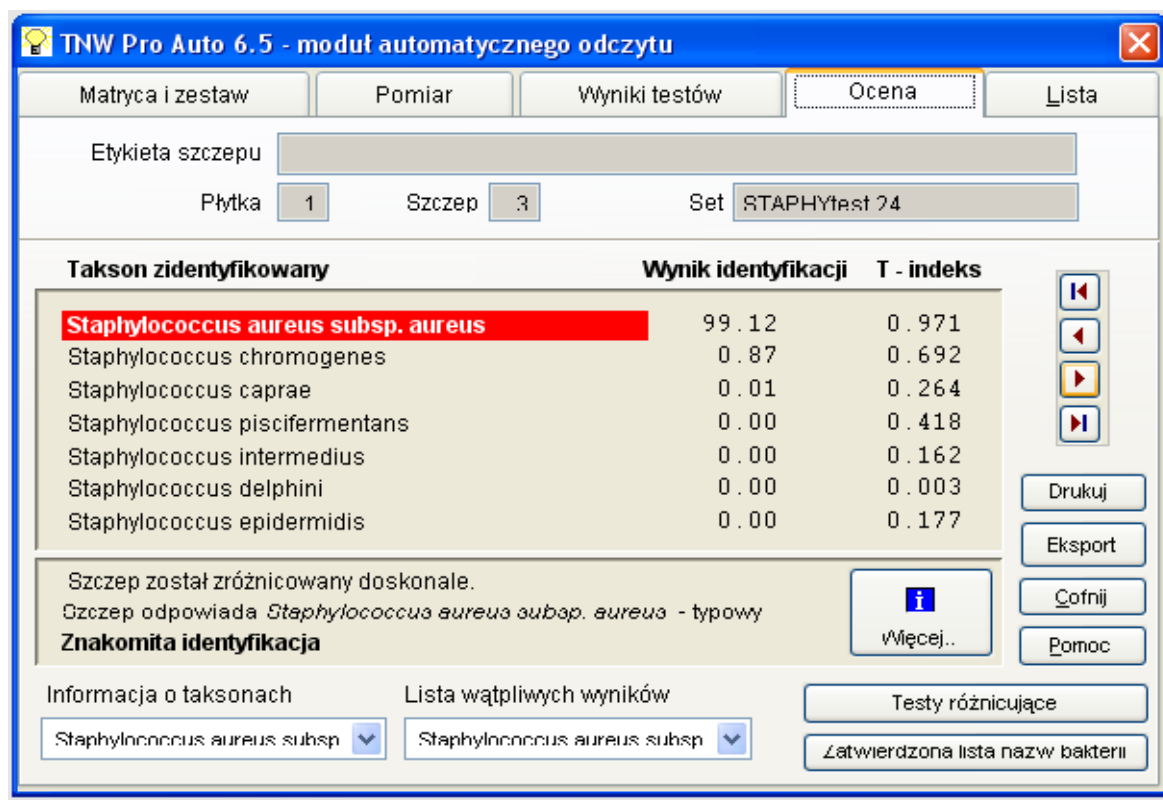


Rycina 3.1. Hodowla ziarniaków Gram dodatnich, pochodzących od badanych osób, na podłożu Chapmana [zdjęcie własne].

3.2.1.2. Identyfikacja gatunkowa *S. aureus*

Przynależność gatunkową uzyskanych szczepów określano na podstawie oceny wytwarzania katalazy oraz oceny testów na obecność koagulazy związanej (test aglutynacji szkiełkowej) i wolnej (test probówkowy) oraz testem biochemicznym STAPHYtest 24, działającym w systemie MICROLATEST® (Erba Lachema) z odczytem automatycznym w programie TNW Pro Auto 6.5 (Ryc.3.2.).

Dodatkowo potwierdzano przynależność gatunkową *S. aureus* za pomocą gatunkowo-specyficznego PCR dla genu *femB* (patrz punkt 3.2.3.2.).



Rycina 3.2. Odczyt automatyczny testu biochemicznego STAPHYtest24 w programie TNW Pro Auto 6.5.

3.2.1.3. Oznaczanie lekowrażliwości

Oznaczenie lekowrażliwości uzyskanych izolatów *S. aureus* przeprowadzono metodą dyfuzyjno - krążkową wg rekomendacji EUCAST (Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), wersja 5.0. Na podłoże Mueller-Hinton agar наносzono równomiernie jałową wymazówkę zawiesiny poszczególnych izolatów o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Na suche podłoża наносzono krążki z antybiotykami przedstawionymi w tabeli 3-1. Po 15 minutach preinkubacji w temperaturze pokojowej następowała inkubacja właściwa w warunkach:

- Temperatura: 33 – 35°C,
- Czas: 16 – 18 godz. (dla cefoksytiny – 24 godz.),
- Atmosfera tlenowa [92].

Tabela 3-1. Antybiotyki wykorzystane w określeniu lekowrażliwości izolatów *S. aureus*.

Oznaczenie	Antybiotyk	Krążek (µg)
FOX	Cefoksytyna	30
E	Erytromycyna	15
Da	Klindamycyna	2
SXT	Trimetoprim/ sulfametoksazol	1,25/ 23,75
Te	Tetracyklina	30
P	Penicylina	10 (IU)

W celu wykrycia ewentualnego występowania mechanizmu oporności indukowanej na makrolidy i linkozamidy typu MLS_B, krążki z erytromycyną 15 µg i klindamycyną 2 µg nakładano w odległości 15 – 26 mm od krawędzi krążków [57].

3.2.1.4. Podłoża hodowlane

Podłoża stałe:

- Agar z dodatkiem 5 % krwi baraniej
 - Skład: - agar wzbogacony,
- 5 % odwłókniona krew barania
 - pH 7,5 ± 0,1
- Podłoże Chapmana
 - Skład: - mannitol
- NaCl
- wyciąg wołowy
- trzustkowy hydrolizat kazeiny
- pepsynowy hydrolizat tkanki zwierzęcej
- 0,2% alkoholowy roztwór czerwieni fenolowej
- agar
- woda destylowana
 - pH 7,4 ± 0,2

- Podłoże Mueller – Hinton agar (MHA)
 - Skład: - wyciąg wołowy
- kwaśny hydrolizat kazeiny
- skrobia
- agar
- woda destylowana
 - pH 7,3 ± 0,2

Wszystkie podłoża hodowlane wykorzystane w badaniach zostały przygotowane w Pracowni Pożywek Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2.2. Izolacja genomowego DNA

Materiał genetyczny drobnoustrojów wykorzystany w badaniach molekularnych został wyizolowany za pomocą komercyjnych zestawów do izolacji kwasów nukleinowych. W zestawach tych wykorzystywana jest metoda kolumnkowa, opierająca się na zdolności genomowego DNA do wiązania się do złożów krzemionkowych w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych.

3.2.2.1. Izolacja genomowego DNA ze szczepów *S. aureus*

DNA szczepów *S. aureus* został uzyskany poprzez izolację za pomocą zestawu do izolacji DNA ze śladów biologicznych Sherlock AX firmy A&A Biotechnology. Do izolacji wykorzystano kolonie *S. aureus* pochodzące z 24-godzinnej hodowli na podłożu agarowym.

Postępowano wg następującego schematu, zalecanego przez producenta:

1. Przygotowanie zawiesiny kolonii *S. aureus* (gęstość 4 w skali McFarlanda) w buforze składającym się z 0,3 ml buforu L1.4 i 0,3 ml jałowej wody, w probówkach typu Eppendorf.
2. Dodanie 10 µl lizostafiny o stężeniu 1 mg/µl, inkubacja przez 10 minut w temp. 37°C

3. Dodanie 20 µl Proteinazy K, dokładne wymieszanie próbek, inkubacja w temp. 50°C przez 1,5 – 2 godz.
4. Przeniesienie zawartości probówek na mikrokolumny *Filtr 1*.
5. Wirowanie: 1 minuta, 5 000 RPM, temp. pokojowa.
6. Przeniesienie przesączu na właściwe mikrokolumny oczyszczające *Spin 10AX*.
7. Wirowanie: 1 minuta, 5 000 RPM, temp. pokojowa.
8. Wymiana probówek wirowniczych, dodanie 600 µl roztworu płuczającego K2.
9. Powtórzenie punktów 7 i 8.
10. Wirowanie: 1 minuta, 5 000 RPM, temp. pokojowa.
11. Wymiana probówek wirowniczych, dodanie 350 µl roztworu elucyjnego K3, inkubacja 2 minuty w temp. pokojowej.
12. Wirowanie: 1 minuta, 5 000 RPM, temp. pokojowa.
13. Dodanie 350 µl roztworu elucyjnego K3, inkubacja 1 minutę w temp. pokojowej.
14. Wirowanie: 1 minuta, 5 000 RPM, temp. pokojowa.
15. Przeniesienie eluatów (ok 700 µl) do probówek typu Eppendorf, dodanie 5 µl wzmacniacza precypitacji oraz 600 µl izopropanolu, dokładne wymieszanie próbek.
16. Wirowanie: 10 minut, 12 000 RPM, temp. pokojowa.
17. Złanie supernatantu, dodanie do niebiesko zabarwionego osadu DNA 500 µl 70% etanolu, wymieszanie próbek.
18. Wirowanie: 5 minut, 12 000 RPM, temp. pokojowa
19. Złanie supernatantu, osuszenie probówek 15 minut w temp. pokojowej.
20. Zawieszenie osadu DNA w 100 µl jałowej wody destylowanej

3.2.2.2. Izolacja genomowego DNA z wymazów z gardła

Materiał genetyczny do badań na obecność DNA *C. pneumoniae* został wyizolowany z wymazów z tylnej ściany gardła pacjentów przy użyciu zestawu Swab firmy A&A Biotechnology.

Próbki były izolowane w ciągu 24 godzin od momentu pobrania materiału.

Postępowano wg schematu zalecanego przez producenta:

1. Umieszczenie wymazówek z wymazem z tylnej ściany gardła w probówkach typu Eppendorf zawierających 0,7 ml buforu lizującego RL.
2. Dodanie 20 µl proteinazy K, zworteksowanie próbki i inkubacja w temp. 37°C przez 20 minut.
3. Przeniesienie zawartości probówek na mikrokolumny.
4. Wirowanie: 1 minuta, 12 000 RPM, temp. pokojowa.
5. Wymiana probówek wirowniczych, dodanie 500 µl buforu płuczającego A1.
6. Powtórzenie punktów 4 i 5.
7. Wirowanie: 2 minuty, 12 000 RPM, temp. pokojowa.
8. Przeniesienie mikrokolumn do probówek typu Eppendorf, dodanie 150 µl jałowej wody destylowanej ogrzanej do temp. 75°C.
9. Inkubacja w temp. pokojowej przez 3 minuty.
10. Wirowanie: 1 minuta, 12 000 RPM, temp. pokojowa.
11. Materiał zebrany w probówce typu Eppendorf zawiera wyizolowany DNA.

3.2.3. Diagnostyka molekularna

3.2.3.1. Pomiar ilości i ocena jakości DNA

Jakość wyizolowanego DNA oceniono na aparacie NanoDrop 2000, za pomocą pomiaru spektrofotometrycznego. Określono również stężenie uzyskanego materiału. Pomiary poziomu absorpcji wodnego roztworu DNA wykonano przy długościach fal 260, 280 i 320 nm, przy drodze optycznej 1 cm.

Stężenie DNA obliczono wg wzoru:

$$C \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{rozcieńczenie}$$

Gdzie:

C – stężenie DNA w danej próbce

A_{260} – absorbancja przy długości fali $\lambda = 260 \text{ nm}$

A_{320} – absorbancja przy długości fali $\lambda = 320$ nm

50 ($\mu\text{g/ml}$) – stężenie DNA odpowiadające 1 OD

Stopień odbiałczenia próbek określono na podstawie stosunku:

$$A_{260}/A_{280}$$

Gdzie:

A_{260} – absorbancja przy długości fali $\lambda = 260$ nm (maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych)

A_{280} – absorbancja przy długości fali $\lambda = 280$ nm (maksimum absorpcji dla białek)

Na prawidłowy stopień oczyszczenia próbki z białek wskazuje wartość współczynnika preparatu między 1,8 – 2,0 [93].

Ocenę czystości DNA na aparacie NanoDrop 2000 wykonano dzięki uprzejmości mgr Aleksandry Romaniuk w Katedrze i Zakładzie Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,.

3.2.3.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy

Uzyskany genomowy DNA poddano amplifikacji za pomocą łańcuchowych reakcji polimerazy (PCR) z określonymi starterami, specyficznymi dla danej reakcji. Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono w termocyclerze Mastercycler Pro S (Eppendorf).

Gatunkowo specyficzny PCR dla *S. aureus*

Uzyskany z izolatów *S. aureus* DNA poddano gatunkowo-specyficznej reakcji PCR dla gronkowców złocistych, polegającej na klasycznej amplifikacji fragmentu genu *femB* charakterystycznego dla *S. aureus*. W reakcji zastosowano startery o następującej sekwencji:

- *femB*-F – 5' – TTACAGAGTTAACTGTTACC – 3'
- *femB*-R – 5' – ATACAAATCCAGCACGCTCT – 3'

W wyniku reakcji powstaje produkt o długości 651 pz [94].

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 μ l. Skład mieszaniny był następujący (objętość na 1 próbkę) (Tab. 3-2.):

Tabela 3-2. Składniki mieszaniny reakcyjnej gatunkowo-specyficznego PCR dla *S. aureus*

Składnik	Objętość (μ l)
bufor PCR	2,5
d-NTPs	2,5
MgCl ₂	1,5
Startery	po 0,5
polimeraza <i>Taq</i>	0,5
woda destylowana	15
badane DNA	2

Amplifikację przeprowadzono w następujących warunkach:

- | | | | |
|---------------------------|------|-----------|------------|
| • Denaturacja wstępna: | 94°C | 4 minuty | } 30 cykli |
| • Denaturacja: | 94°C | 45 sekund | |
| • Przyłączenie starterów: | 50°C | 45 sekund | |
| • Synteza: | 72°C | 1 minuta | |
| • Synteza końcowa: | 72°C | 10 minut | |

Oznaczenie genów regulatorowych *agr* w szczepach *S. aureus*

W celu wykrycia genów regulatorowych *agr* i oznaczenia grup specyficzności *agr* w izolatach *S. aureus* pochodzących od nosicieli wykonano dwie reakcje w układzie duplex PCR. W każdej reakcji jednym z zastosowanych primerów był wspólny starter forward odpowiadający sekwencji konserwatywnej genu *agrB*:

- *agrF*: 5, - ATGCACACTGGTGCACATGC -3'.

Sekwencje pozostałych starterów oparto o polimorfizm genów *agrC* (primery dla klas specyficzności *agr* II i IV) oraz *agrD* (primery dla klas specyficzności *agr* I i III):

- *agrI* 5' - GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT - 3'

- wielkość produktu 440 pz;
- *agrII* 5' - GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC - 3'
- wielkość produktu 572 pz;
- *agrIII* 5' - CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC - 3'
- wielkość produktu 406 pz;
- *agrIV* 5' - CGATAATGCCGTAATACCCG - 3'
- wielkość produktu 588 pz.

Ze względu na zbliżone wielkości produktów jedna reakcja duplex PCR zawierała startery dla klas specyficzności *agr* I i *agr* II, druga dla klas specyficzności *agr* III i *agr* IV [95].

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej PCR wynosiła 25 µl. Skład mieszaniny był następujący (objętość na 1 próbkę) (Tab. 3-3.):

Tabela 3-3. Składniki mieszaniny reakcyjnej PCR reakcji określającej klasy specyficzności genów regulatorowych *agr*.

Składnik	Objętość (µl)
bufor PCR	2,5
d-NTPs	2,5
MgCl ₂	1,5
Startery	po 0,6
polimeraza <i>Taq</i>	0,5
woda destylowana	14,2
badane DNA	2

Amplifikację przeprowadzono w następujących warunkach:

- | | | | |
|---------------------------|------|----------|------------|
| • Denaturacja wstępna: | 94°C | 5 minut | } 35 cykli |
| • Denaturacja: | 94°C | 1 minuta | |
| • Przyłączenie starterów: | 55°C | 1 minuta | |
| • Synteza: | 72°C | 2 minuty | |
| • Synteza końcowa: | 72°C | 2 minuty | |

Wykrywanie obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z gardła

Genomowy DNA uzyskany z wymazów z gardła poddano amplifikacji za pomocą reakcji PCR wykorzystując zestaw diagnostyczny *Chlamydia pneumoniae* firmy DNA Gdańsk. W zestawie tym wykrycie materiału genetycznego drobnoustroju polega na powieleniu fragmentu genu *ompA* *C. pneumoniae* w układzie nested-PCR. Ten typ reakcji polega na wykonaniu po sobie dwóch reakcji PCR, przy czym produkt PCR pierwszej reakcji stanowi matrycę dla kolejnej reakcji PCR. Startery w drugiej reakcji PCR są komplementarne do sekwencji znajdujących się wewnątrz powielanego wcześniej fragmentu DNA [93].

W zastosowanym zestawie w pierwszej reakcji powstaje produkt o długości 424 pz, natomiast w drugiej – 147 pz.

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR-OUT wynosiła 50 µl. Skład mieszaniny był następujący (objętość na 1 próbkę) (Tab. 3-4.):

Tabela 3-4. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR-OUT dla *C. pneumoniae*

Składnik	Objętość (µl)
Master Mix PCR-OUT	40,5
d-NTPs	5
polimeraza <i>Taq</i> (PCR-OUT)	1,5
badane DNA	3

Amplifikację „OUT” przeprowadzono w następujących warunkach:

- | | | | |
|---------------------------|------|-----------|------------|
| • Denaturacja wstępna: | 94°C | 5 minut | } 35 cykli |
| • Denaturacja: | 94°C | 30 sekund | |
| • Przyłączenie starterów: | 55°C | 45 sekund | |
| • Synteza: | 72°C | 30 sekund | |
| • Synteza końcowa: | 72°C | 5 minut | |

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR-IN wynosiła 50 µl. Skład mieszaniny był następujący (objętość na 1 próbkę) (Tab. 3-5.):

Tabela 3-5. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR-IN dla *C. pneumoniae*.

Składnik	Objętość (μl)
Master Mix PCR-IN	40,5
d-NTPs	5
Polimeraza <i>Taq</i> (PCR-IN)	1,5
Produkt PCR-OUT	3

Amplifikację „IN” przeprowadzono w następujących warunkach:

- | | | | |
|---------------------------|------|-----------|------------|
| • Denaturacja wstępna: | 94°C | 5 minut | } 35 cykli |
| • Denaturacja: | 94°C | 30 sekund | |
| • Przyłączenie starterów: | 48°C | 45 sekund | |
| • Synteza: | 72°C | 20 sekund | |
| • Synteza końcowa: | 72°C | 2 minuty | |

3.2.3.3. Elektroforeza

Wszystkie produkty poszczególnych reakcji PCR naniesiono w 1,5% żel agarozowy z dodatkiem bromku etydyny w celu sprawdzenia ich jakości. Do kieszonek nakładano mieszaninę 4 μl produktów PCR i 2 μl 2x stężonego buforu obciążającego. Ocena wielkości uzyskanych produktów została dokonana na podstawie markera wielkości DNA M100-500 w świetle ultrafioletowym.

3.2.4. Diagnostyka immunoenzymatyczna

W testach immunoenzymatycznych swoiste przeciwciała są znakowane enzymem. Testy te, w tym ELISA, znalazły szerokie zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej, zarówno do oznaczania antygenów, jak i miana przeciwciał. Charakteryzują się zwykle bardzo wysoką czułością.

Odczytu absorbancji substancji ocenianych tą metodą dokonano używając czytnika mikropłytek Reader 250 (bioMérieux) (Ryc. 3.3.).



Rycina 3.3. Czytnik mikropłytek Reader 250 (bioMérieux) [zdjęcie T. Karpiński]

Oznaczenie miana przeciwciał anti-*C. pneumoniae*

Stężenie przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w surowicy krwi oznaczano za pomocą zestawu Chlamydia pneumoniae IgG ELISA firmy Demeditec Diagnostics GmbH (Ryc. 3.4.). Antygeny wykorzystane do opłaszczenia studzienek odpowiadają antygenom EB *C. pneumoniae*. Zestaw ten służy do ilościowej oceny miana przeciwciał w ludzkiej surowicy i osoczu cytrynianowym. Czulość testu wynosi 90,2 %, swoistość 91,7 %.



Rycina 3.4. Zestaw diagnostyczny ELISA Chlamydia pneumoniae IgG ELISA firmy Demeditec Diagnostics GmbH [zdjęcie własne]

Postępowano według zaleceń producenta:

1. Przygotowanie rozcieńczenia badanych surowic 1:101 w IgG Sample Diluent.
2. Umieszczenie w studzienkach płytki titracyjnej po 100 µl kontroli dodatniej, kontroli ujemnej, 2 próbek cut-off oraz 92 próbek badanych surowic.
3. Inkubacja 1 godz., temp. 37°C.
4. Aspiracja zawartości studzienek, płukanie 3 razy 300 µl roztworu płuczącego.
5. Dodanie 100 µl koniugatu anti-IgG C. pneumoniae do każdej studzienki.
6. Inkubacja w zaciemnionym miejscu, 30 min., temp. pokojowa
7. Aspiracja zawartości studzienek, płukanie 3 razy 300 µl roztworu płuczącego.
8. Dodanie 100 µl roztworu TMB Substrate do każdej studzienki.
9. Inkubacja w zaciemnionym miejscu, 15 min., temp. pokojowa.
10. Dodanie 100 µl roztworu Stop hamującego reakcję do każdej studzienki.

11. Pomiar absorpcji poszczególnych próbek przy długości fali $\lambda=492$ nm.

Interpretacja wyniku:

Aby wyliczyć poziom surowiczych przeciwciał w jednostkach U (units) wykorzystano wzór:

$$(\text{Abs} \times 10) / \text{cut-off} = U$$

Gdzie:

Abs – wartość absorpcji danego pacjenta

cut-off – wartość cut-off uzyskana w badaniu; dla przeprowadzonych badań wartość ta wynosiła 1,07.

3.3. Analiza statystyczna

W celu analizy statystycznej uzyskanych w badaniach danych wykorzystano program komputerowy Statistica 8 dla systemu operacyjnego Windows.

W analizie porównawczej danych uzyskanych w celu oceny występowania klas specyficzności *agr* u szczepów *S. aureus* zastosowano test nieparametryczny chi-kwadrat.

Dla porównania poziomów nosicielstwa *S. aureus* wśród kobiet i mężczyzn wykorzystano dokładny test Fishera.

Wartość p niższą niż 0,01 uznawano za statystycznie istotną.

4. Wyniki

4.1. *S. aureus*

4.1.1. Ocena stopnia nosicielstwa *S. aureus*

W badanej grupie stwierdzono obecność *S. aureus* w dwukrotnym wymazie z przedsionka nosa u 74 osób, co daje nosicielstwo stałe na poziomie 28 %. 46 wyhodowanych izolatów pochodziło od kobiet, a 28 od mężczyzn (Tab. 4-1.).

Tabela 4-1. Liczba badanych i nosicieli z podziałem na płeć oraz ocena istotności różnicy poziomów nosicielstwa wśród kobiet i mężczyzn (z wykorzystaniem dokładnego testu Fishera).

	Liczba badanych	Szczepy <i>S. aureus</i>		Wartość p
		liczba	%	
Kobiety	143	46	17	0,1302
Mężczyźni	121	28	11	
Ogółem	264	74	28	

Legenda: wartość $p < 0,01$ uznawano za statystycznie istotną.

4.1.2. Ocena lekowrażliwości uzyskanych izolatów *S. aureus*

Wszystkie badane izolaty *S. aureus* to szczepy metycylinowrażliwe, w analizowanej grupie nie stwierdzono występowania szczepów MRSA. Każdy badany szczep charakteryzuje się również wrażliwością na trimetoprim/sulfametoksazol. Stwierdzono niewielki odsetek izolatów opornych na tetracyklinę – 6,8 %. U 13,5 % badanych szczepów *S. aureus* wykryto występowanie mechanizmu oporności indukowanej na makrolidy i linkozamidy

(MLS_B). 13 spośród analizowanych szczepów (17,6 %) charakteryzowało się wrażliwością na penicylinę (Tab. 4-2.).

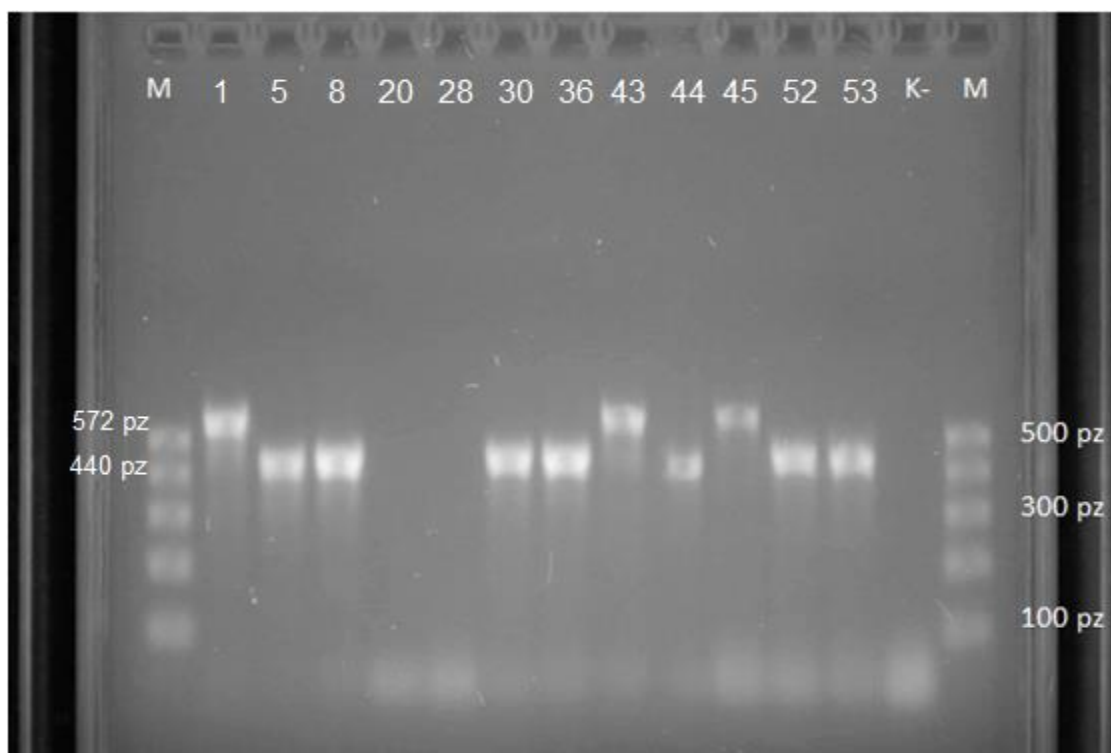
Tabela 4-2. Lekooporność wyizolowanych szczepów *S. aureus*.

Antybiotyk	Wrażliwe (S)		Oporne (R)	
	Liczba	%	Liczba	%
FOX	74	100	0	0
E	64	86,5	10	13,5
Da	63	85,1	11	14,9
SXT	74	100	0	0
Te	69	93,2	5	6,8
P	13	17,6	61	82,4

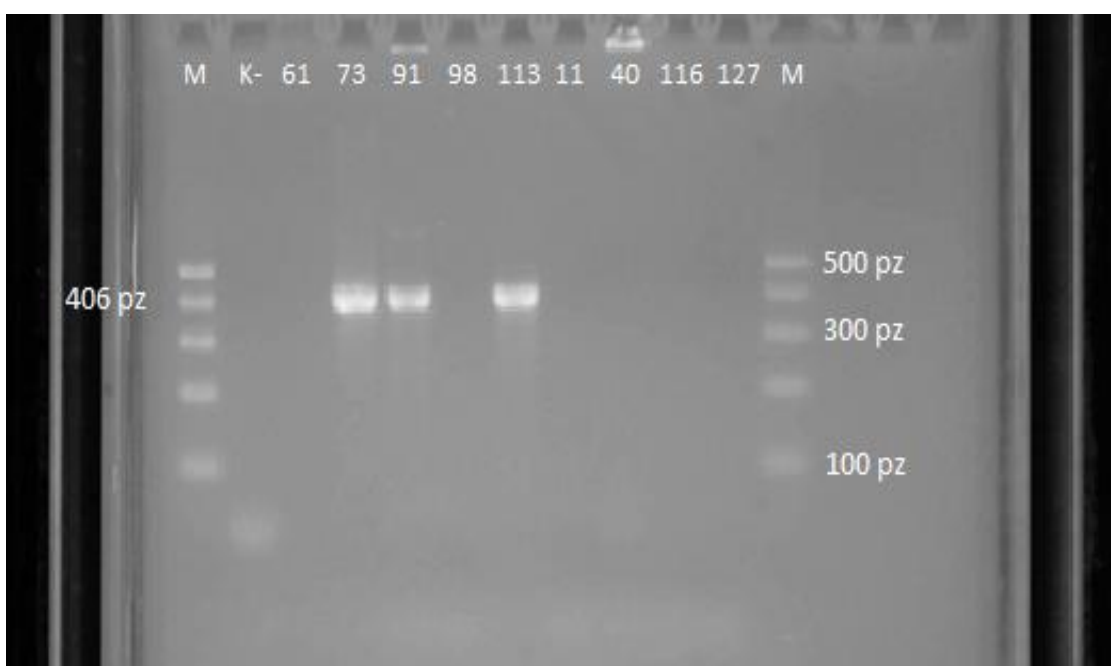
Legenda: FOX – cefoksytyna, E – erytromycyna, Da – klindamycyna, SXT – trimetoprim/sulfametoksazol, Te – tetracyklina P – penicylina.

4.1.3. Ocena grup specyficzności genów regulatorowych *agr*

Na podstawie przeprowadzonej reakcji PCR zaklasyfikowano badane izolaty *S. aureus* do poszczególnych grup specyficzności genów regulatorowych *agr*. Spośród 74 analizowanych szczepów u 39 (52,7 %) wykazano obecność klasy specyficzności genów regulatorowych *agr* I, u 16 szczepów – *agr* II, u 11 szczepów – *agr* III, u 2 szczepów – *agr* IV. Jeden izolat wykazał obecność klas specyficzności *agr* I i *agr* IV. U 5 szczepów nie stwierdzono obecności żadnej z klas genów regulatorowych *agr* (Ryc. 4.1., Ryc. 4.2., Tab. 4-3.).



Rycina 4.1. Analiza elektroforetyczna reakcji PCR dla genów regulatorowych *agr* klasy I i II.
M – marker, K- – kontrola ujemna, pozostałe kieszonki - pacjenci.



Rycina 4.2. Analiza elektroforetyczna reakcji PCR dla genów regulatorowych *agr* klasy III i IV.
M – marker, K- – kontrola ujemna, pozostałe kieszonki - pacjenci.

Tabela 4-3. Podział szczepów *S. aureus* na klasy specyficzności genów regulatorowych *agr*.

Klasa <i>agr</i>	Szczepy <i>S. aureus</i>	
	Liczba	%
Klasa <i>agr</i> I	39	52,7
Klasa <i>agr</i> II	16	21,6
Klasa <i>agr</i> III	11	14,9
Klasa <i>agr</i> IV	2	2,7
Klasa <i>agr</i> I + <i>agr</i> IV	1	1,4
brak <i>agr</i>	5	6,7

Analiza statystyczna częstości występowania poszczególnych klas specyficzności genów regulatorowych wykazała, że istotnie częściej niż pozostałe grupy występuje klasa *agr* I (Tab. 4-4.).

Tabela 4-4. Ocena istotności różnic częstości występowania poszczególnych klas specyficzności genów regulatorowych *agr* (z wykorzystaniem testu chi-kwadrat).

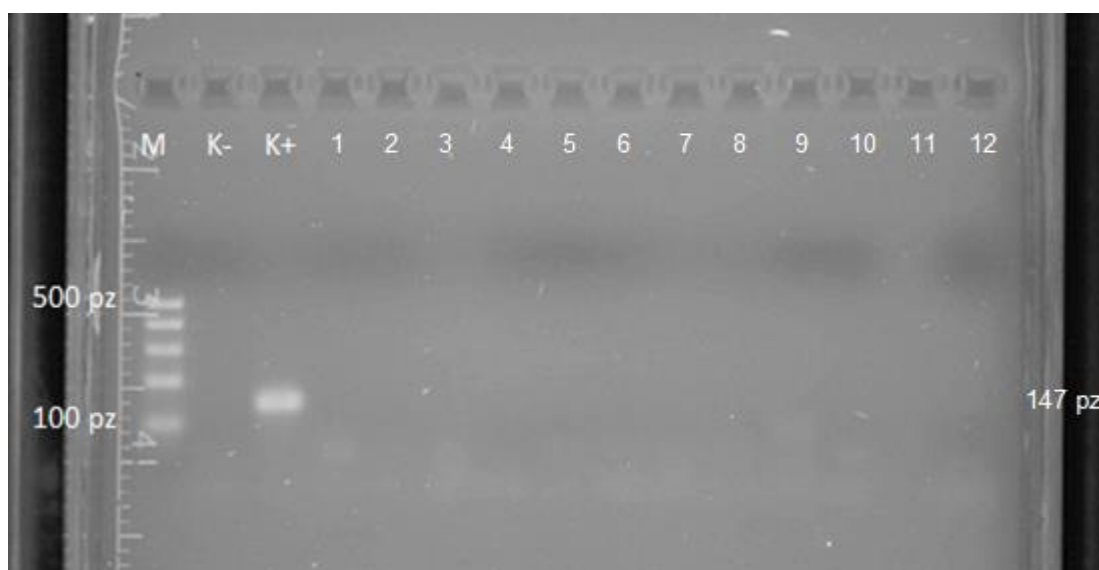
Klasa <i>agr</i>	I	II	III	IV	I + IV	brak
I		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
II	-		0,3359	<0,01	<0,01	0,0164
III	-	-		0,0126	<0,01	0,1336
IV	-	-	-		0,5637	0,2568
I + IV	-	-	-	-		0,1025
brak	-	-	-	-	-	

Legenda: W tabeli podano wartości p, wartość **p < 0,01** uznawano za statystycznie istotną.

4.2. *C. pneumoniae*

4.2.1. Ocena występowania *C. pneumoniae*

Na podstawie przeprowadzonych reakcji PCR nie stwierdzono obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z tylnej ściany gardła u żadnego badanego (Ryc. 4.3.).



Rycina 4.3. Analiza elektroforetyczna reakcji PCR dla *C. pneumoniae*. M – marker, K- – kontrola ujemna, K+ – kontrola dodatnia, pozostałe kieszonki - pacjenci.

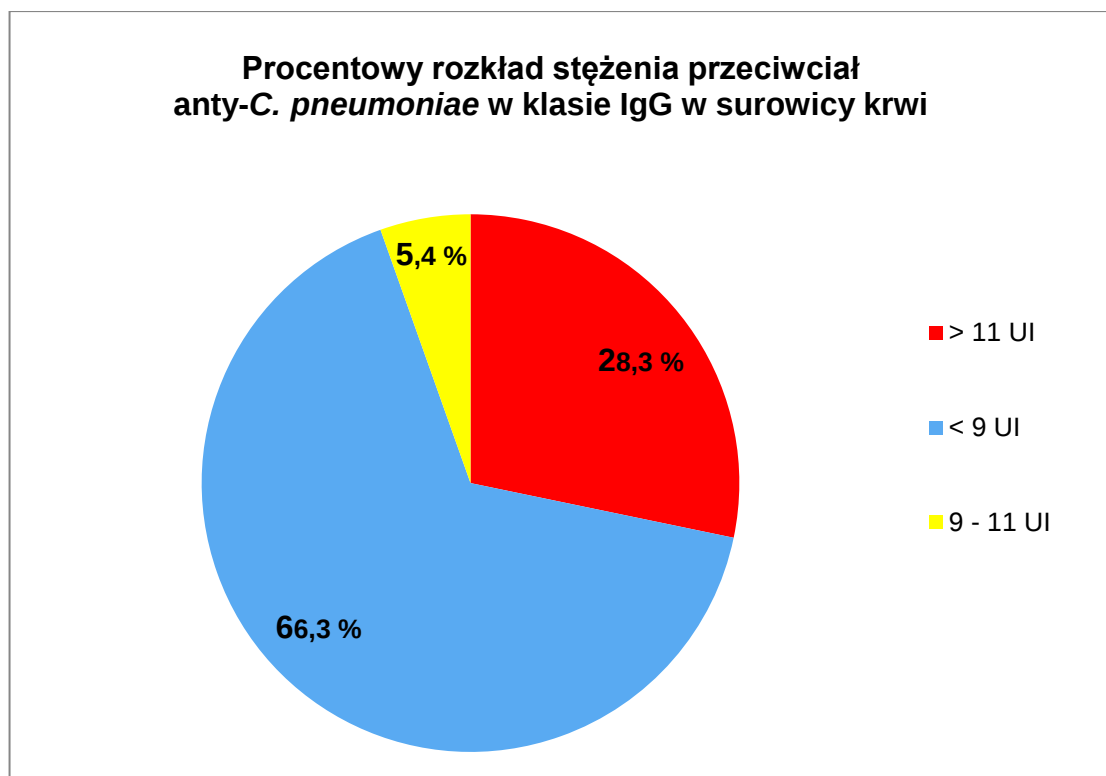
4.2.2. Ocena występowania przeciwciał anti-*C. pneumoniae*

W badaniu ELISA określającym miano przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi przyjęto kryteria oceny i interpretacji wyników według producenta zestawu diagnostycznego, tj.:

Wynik pozytywny	> 11 UI
Wynik wątpliwy	9-11 UI
Wynik negatywny	< 9 UI

W związku z powyższym, stwierdzono podwyższone stężenie przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi u 26 pacjentów,

tj. 28,3 %. U 61 osób, czyli 66,3 % badanych miano przeciwciał mieściło się w granicach wartości prawidłowych. Wynik wątpliwy stwierdzono u 5 badanych (5,4 %) (Wyk. 4-1.). Oznaczenia stężenia przeciwciał dokonano u tych samych pacjentów, u których oceniano nosicielstwo *C. pneumoniae*.



Wykres 4-1. Procentowy rozkład stężeń przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi badanej grupy.

5. Omówienie wyników i dyskusja

Nadrzędnymi celami niniejszej rozprawy są ocena stopnia nosicielstwa *S. aureus* w przedsionku jamy nosowej oraz ocena stopnia nosicielstwa *C. pneumoniae* na tylnej ścianie gardła, a także określenie częstości występowania zakażeń tym patogenem na podstawie analizy stężeń przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi.

Badaną grupę w niniejszych analizach stanowili w zdecydowanej większości studenci I i II roku studiujący na poznańskich uczelniach. Stałą kolonizację przedsionka jamy nosowej gronkowcem złocistym stwierdzono w tej pracy u 28% przebadanych, zdrowych ochotników. Wyniki te korespondują z innymi badaniami europejskimi, np. Akmatova i wsp. [96] oraz Gamblina i wsp. [97]., chociaż zastosowano w nich odmienną metodykę. Wspomniani autorzy zaprojektowali badania tak, aby pacjenci samodzielnie pobierali sobie wymazy. Niesie to jednak ze sobą duże ryzyko błędu przedlaboratoryjnego. Podobny poziom nosicielstwa w analizowanych przez siebie grupach badanych uzyskali również Andersen i wsp. – 26,3 % [98] oraz Mehraj i wsp. – 21,9 % [99].

Wspomniani autorzy stwierdzili równocześnie, że kolonizacja *S. aureus* wśród mężczyzn jest istotnie wyższa niż u kobiet (u Andersena i wsp. np. poziom nosicielstwa wśród mężczyzn wynosi 30,1 %, a u kobiet 22,6 %) [98, 99]. W niniejszej pracy zaobserwowano odmienne wyniki: poziom nosicielstwa jest wyższy w populacji kobiet. Jednak analiza statystyczna wykazała, że nie jest to różnica istotna statystycznie, w związku z czym nie stwierdzono korelacji pomiędzy płcią a nosicielstwem gronkowca złocistego.

Interesująca jest praca Köcka i wsp., którzy uzyskali w swoich badaniach nosicielstwo *S. aureus* w przedsionku jamy nosowej na poziomie 41 %, w tym 1,7 % stanowiły szczepy MRSA. Wysoki poziom kolonizacji, odbiegający od wyniku uzyskanego w niniejszej pracy, może wynikać z dużej rozpiętości wiekowej grupy badanej (7-97 lat) oraz obecności w niej osób będących pracownikami służby zdrowia, a także mających częsty kontakt ze służbą zdrowia. Autorzy nie podali poziomów nosicielstwa dla wyodrębnionych przez

siebie grup wiekowych, dlatego też trudno porównać je z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy [100]. Esposito i wsp. również stwierdzili wyższy poziom nosicielstwa w przedsionku jamy nosowej niż określony w tej pracy (39,2 %). Rozbieżność wynika prawdopodobnie z faktu, iż ocena dotyczyła młodszej populacji, a mianowicie dzieci w wieku szkolnym, u których poziom nosicielstwa jest wyższy niż u dorosłych [101].

Rezultaty niniejszej pracy korelują natomiast z doniesieniami naukowców ze Stanów Zjednoczonych, którzy na przestrzeni lat określali nosicielstwo *S. aureus* w granicach 30 % [102, 103]. Nieco niższy poziom kolonizacji stwierdzili w swoich doniesieniach badacze azjatyccy – 20,2 - 23,4 % [104, 105, 106]. Niespodziewane wyniki uzyskali natomiast Sharma i wsp. – nosicielstwo wśród ludności w Delhi w Indiach na poziomie 12 %, w tym u pracowników służby zdrowia 13,3 % [107]. Badacze Ci zastosowali rutynowe procedury i metody diagnostyczne, pobierając od badanych tylko jednorazowo wymaz z przedsionka jamy nosowej. Są to dość zastanawiające rezultaty, szczególnie biorąc pod uwagę gęstość zaludnienia, warunki socjoekonomiczne oraz dostęp do opieki medycznej w analizowanych rejonach. Poziom kolonizacji gronkowcem złocistym analizowano również w krajach afrykańskich. Okamo i wsp. uzyskali wyniki zbliżone do średniej ogólnoświatowej (21%), a grupę badaną stanowili studenci [108]. Z kolei Aiken i wsp. stwierdzili nosicielstwo u 8,9 % badanych. Rezultat ten był zaskoczeniem dla samych badaczy, zakładali oni bowiem, że kolonizacja *S. aureus* w analizowanej przez nich populacji będzie zdecydowanie wyższy ze względu na niski poziom higieny oraz gęstość zaludnienia [109].

Wszystkie izolaty pochodzące od nosicieli w niniejszych badaniach charakteryzują się wrażliwością na metycylinę, nie zaobserwowano kolonizacji szczepami MRSA. Wyniki te korelują częściowo z rezultatami wspomnianego już wcześniej Bischofa i wsp., którzy w analizowanej przez siebie populacji studentów stwierdzili obecność dwóch szczepów średniowrażliwych na metycylinę. Nie określili jednak dokładnie mechanizmu tej oporności [102]. Natomiast dane europejskie uzyskane przez przytoczonych uprzednio Gambolina i wsp. oraz Köcka i wsp. sugerują poziom nosicielstwa szczepów MRSA w granicach 0,7 – 1,9 % [97, 100]. Wyniki te również tylko w niewielkim stopniu można odnieść do niniejszej pracy ze względu na duże

zróżnicowanie wiekowe badanych populacji oraz różnice metodologiczne w protokołach badawczych.

Szczepy *S. aureus* analizowane w tej pracy charakteryzują się dobrą wrażliwością na pozostałe antybiotyki, które są rutynowo stosowane w terapii zakażeń wywołanych przez szczepy MSSA. Stwierdzono 100 % wrażliwość na trimetoprim/ sulfametoksazol oraz niewielki odsetek izolatów opornych na tetracykliny (6,8 %). 13,5 % szczepów wykazało mechanizm oporności indukowanej na makrolidy i linkozamidy typu MLS_B, co automatycznie wyklucza wymienione leki (oraz streptograminy B) z terapii. Lall i wsp. w swoich badaniach stwierdzili występowanie mechanizmów oporności na te antybiotyki u 20,3 % szczepów gronkowców złocistych. Autorzy analizując szczepy MSSA i MRSA pochodzące z zakażeń zauważyli, że zdecydowanie częściej mechanizm oporności na makrolidy i linkozamidy, zarówno indukowanej jak i konstytutywnej, występuje u szczepów MRSA. We wspomnianych badaniach mechanizm oporności indukowanej MLS_B wykryto u 6 % izolatów MSSA [110]. Podobne rezultaty badań uzyskali Aamot i wsp., którzy wykryli oporność na te antybiotyki u 5 % szczepów metycylinowrażliwych. Autorzy Ci jednak nie określali typu mechanizmu oporności [111]. Przytoczone wyniki są znacznie niższe niż uzyskane w niniejszej pracy. Prawdopodobnie wynika to ze zbyt częstego stosowania makrolidów i linkozamidów w leczeniu otwartym w Polsce. Niniejszych badań natomiast nie można w pełni odnieść do wspomnianych wcześniej analiz Bischoffa i wsp., którzy określali wrażliwość tylko na azytromycynę, uzyskując blisko 26 % szczepów opornych [102].

W niniejszych badaniach oceniano również wrażliwość analizowanych szczepów na penicylinę. Antybiotyk ten nie jest rekomendowany w leczeniu zakażeń gronkowcowych ze względu na wysoki odsetek szczepów opornych, które produkują β -laktamazy. Celem była jedynie szacunkowa ocena występowania takich izolatów u nosicieli *S. aureus*. Stwierdzono 17,6 % szczepów wrażliwych na penicylinę. Rezultaty tych badań korelują z wynikami uzyskanymi przez Chen B. i wsp., którzy stwierdzili 17,5 % szczepów wrażliwych na ten antybiotyk [104]. Nieco wyższy odsetek izolatów charakteryzujących się wrażliwością na penicylinę stwierdzili Aamot i wsp. (25 %) [111]. Wyniki te odbiegają jednak znacznie od doniesień niemieckich,

gdzie autorzy wyizolowali 35,7 % [100] oraz 42,3 % [99] szczepów penicylinowrażliwych. Otrzymane wyniki są zapewne rezultatem dobrze prowadzonej polityki antybiotykowej w tym kraju.

Gronkowiec złocisty jest drobnoustrojem, który posiada zdolność bezobjawowej kolonizacji błon śluzowych i/lub skóry człowieka, ale może też stanowić czynnik etiologiczny wielu schorzeń, o zróżnicowanym przebiegu i nasileniu, które mogą rozwijać się zarówno miejscowo, układowo, jaki i ogólnoustrojowo. Właściwości te są wynikiem między innymi obecności w materiale genetycznym *S. aureus* globalnych systemów regulacji genów warunkujących produkcję toksyn i czynników przylegania. W niniejszej pracy analizowano system *agr*. Jest on odpowiedzialny za kontrolę ekspresji wielu substancji niezbędnych w procesach adherencji oraz adaptacji gronkowców do nowego środowiska (gospodarza) i jego kolonizacji. System ten warunkuje również produkcję egzotoksyn, odgrywających kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się i wirulencji gronkowca złocistego. Na podstawie polimorfizmu kilku genów wchodzących w skład kompleksu *agr* wyróżnia się cztery klasy specyficzności genów regulatorowych *agr*.

Badane w tej pracy szczepy *S. aureus* pochodzące od nosicieli, w celu określenia wspomnianych klas specyficzności *agr*, zostały poddane analizie za pomocą reakcji PCR duplex. Stwierdzono, że ponad połowa szczepów – 52,7 % - należy do klasy specyficzności *agr I*. 21,6 % izolatów wykazało obecność genów klasy *agr II*, a 14,9 % - *agr III*. Klasa specyficzności *agr IV* została stwierdzona tylko u pojedynczych szczepów (w tym u jednego wykazano obecność klas *agr I* i *agr IV*). Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że w porównaniu z pozostałymi grupami specyficzności klasa *agr I* występuje w analizowanych szczepach istotnie częściej.

Wyniki te korelują częściowo z badaniami Garbacz i wsp., którzy stwierdzili przynależność analizowanych przez siebie szczepów gronkowca złocistego pochodzących od nosicieli przede wszystkim do grup specyficzności *agr I* i *agr III* [112]. Podobne rezultaty w badanej grupie nosicieli uzyskali również Collery i wsp. [113]. Z kolei van Leeuwen i wsp. nie stwierdzili w ogóle występowania klasy specyficzności *agr III* wśród analizowanych przez siebie izolatów [114]. Uzyskane wyniki można odnieść też do pracy Jarrauda i wsp., którzy badali kliniczne szczepy MSSA

pochodzące z zakażeń. Stwierdzili oni, że izolaty należące do klasy *agr III* są najczęściej odpowiedzialne za TSS, natomiast klasy *agr IV* – za zakażenia skórne, w tym liszajec i SSSS [115]. Potwierdza to niejako fakt wystąpienia niewielkiego odsetka szczepów tych klas specyficzności *agr* w niniejszych badaniach. Można również zauważyć pewną korelację pomiędzy powyższymi badaniami, a pracą Yoon i wsp. Naukowcy Ci analizując szczepy MRSA pochodzące z zakażeń zaobserwowali, że infekcje wywołane przez szczepy środowiskowe (nie szpitalne) należą głównie do klasy *agr I* [116]. Na podstawie cytowanych badań można zatem wnioskować, iż grupa specyficzności *agr I* jest odpowiedzialna przede wszystkim za kodowanie substancji i czynników, które umożliwiają gronkowcom złocistym przetrwanie oraz rozprzestrzenianie się w środowisku, a także bezobjawową kolonizację organizmu gospodarza.

C. pneumoniae to drobnoustroj atypowy będący obligatoryjnym pasożytem wewnątrzkomórkowym. Zakażenia wywołane przez ten patogen dotyczą przede wszystkim układu oddechowego. *C. pneumoniae* charakteryzuje się unikatowym cyklem rozwojowym, w którym możliwe jest przejście tego mikroorganizmu w formę przetrwałą, utajoną. Może to skutkować rozwojem zakażeń przewlekłych, a te z kolei stanowią jeden z czynników predisponujących do rozwoju różnych chorób, często o podłożu autoimmunologicznym (m.in. niedokrwiennej choroby serca, miażdżycy czy astmy) [117].

W niniejszych badaniach nie wykryto obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z tylnej ściany gardła u żadnego z 264 zdrowych ochotników, zatem nie stwierdzono nosicielstwa tego drobnoustroju w analizowanej grupie wiekowej, tj. 19 – 25 lat. Wyniki te korelują z badaniami Karpińskiego i wsp., którzy również nie stwierdzili obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z tylnej ściany gardła ani w osadzie śliny zdrowych osób w zbliżonym przedziale wiekowym [118]. Również Min-Chul i wsp. nie wykryli materiału genetycznego *C. pneumoniae* w wymazach z nosogardła ani w płwocinie, chociaż grupę badaną stanowiły osoby z zapaleniem dolnych dróg oddechowych [119]. Zarówno uzyskane w niniejszej pracy jak i przytoczone powyżej wyniki są jednak dość zastanawiające. Jedne z pierwszych doniesień o bezobjawowej kolonizacji gardła tym drobnoustrojem pochodzą sprzed 20 lat

[120] a w większości badań stwierdza się obecność DNA *C. pneumoniae* u niewielkiego odsetka analizowanej populacji. Myging i wsp. wykryli te chlamydie u 2,2 % badanej grupy przy zastosowaniu zarówno konwencjonalnej metody PCR jak i real-time PCR [121]. Podobnie Sidal i wsp. uzyskali w reakcji PCR wyniki dodatnie w 0,9 % wymazach z tylnej ściany gardła, grupę badaną stanowiły osoby z infekcjami górnych dróg oddechowych [122], a Bielicka i wsp. badając grupę dzieci przed adenektomią określili nosicielstwo tego drobnoustroju na poziomie 5,5 % [123]. Zarówno uzyskane w tych badaniach jak i cytowane wyniki odbiegają jednak znacznie od rezultatów doświadczenia Normanna i wsp., którzy stwierdzili obecność DNA *C. pneumoniae* u 22 % badanej przez siebie populacji, aczkolwiek analizowaną grupą były dzieci uczęszczające do żłobków. Niemniej badania te potwierdzają fakt występowania tego mikroorganizmu głównie wśród osób przebywających często w zamkniętych skupiskach [124].

Warto zwrócić uwagę na badania Apfaltera i wsp., którzy przeanalizowali wyniki uzyskane z tych samych próbek, ale badanych w różnych laboratoriach, przy zastosowaniu różnych metod izolacji DNA oraz różnych technik PCR. Naukowcy Ci stwierdzili, że wykorzystane metody różnią się czułością specyficznością, co ma znaczący wpływ na końcowy efekt analizy. Szczególnie istotny jest dobór odpowiedniego sposobu izolacji DNA dla poszczególnych materiałów klinicznych [125]. Podobne wnioski wyciągnęli ze swoich badań Fukano oraz Smieja i wsp.; ustalili, że lepszą czułością charakteryzują się metody nested-PCR [126, 127]. Jest to jednak metoda obarczona znacznym ryzykiem kontaminacji analizowanej próbki, ze względu na wykonywanie dwóch następujących po sobie reakcji PCR, gdzie produkt pierwszej reakcji stanowi substrat drugiej [128]. W innych swoich badaniach Apfalter i wsp. porównując różne techniki PCR określili jako najbardziej czułe te metody, w których wykrywano sekwencję genu *ompA* [129]. Można zatem przyjąć, że w niniejszych badaniach zastosowano wystarczająco czułą metodę detekcji DNA *C. pneumoniae* (wykorzystano zestaw diagnostyczny zawierający startery do amplifikacji genu *ompA*).

Badania dowodzą, że metody PCR, w szczególności ilościowe, są dobrym narzędziem do oceny obecności *C. pneumoniae* w badanym materiale klinicznym. Ich zaletą jest przede wszystkim szybki czas wykonania

w porównaniu z metodami serologicznymi, gdzie wymagane jest dwukrotne badanie surowicy krwi (tzw. parą surowic). Jednak samo wykrycie materiału genetycznego drobnoustroju nie daje nam informacji czy jest to nosicielstwo czy zakażenie, a dzięki badaniu miana przeciwciał możliwe jest określenie fazy choroby. [130, 131].

W grupie obejmującej 92 zdrowych ochotników oznaczono w surowicy krwi również miana przeciwciał w klasie IgG przeciwko *C. pneumoniae* (metodą ELISA). Podwyższone stężenie tych przeciwciał stwierdzono u 28,3 %, natomiast u 5,4 % analizowanej populacji wynik był wątpliwy. Świadczy to o przebyciu w przeszłości zakażenia dróg oddechowych wywołanego przez *C. pneumoniae*. Pacjenci poddani badaniu, u których wykryto podwyższone miano przeciwciał anty-*C. pneumoniae* nie zgłaszali przebiecia epizodu zapalenia płuc w ciągu ostatnich kilku lat, co potwierdza fakt wywoływania przez ten patogen głównie infekcji łagodnych, o przebiegu subklinicznym.

Wyniki te korespondują z analizami cytowanych już Karpińskiego i wsp. Stwierdzili oni podwyższone stężenie przeciwciał przeciwko *C. pneumoniae* w klasie IgG u 29,4 % badanej populacji (również metoda ELISA) [118]. Zarówno jedne jak i drugie wyniki sugerują, że ok. 30 % polskiej populacji do 25 roku życia ma podwyższone miano przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi. Wskazuje to jednoznacznie na przebycie zakażenia o etiologii *C. pneumoniae*.

Warto zwrócić uwagę jak kształtują się wyniki podobnych badań przeprowadzonych w innych krajach. Ben-Yaakov i wsp. analizując stężenie przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w klasie IgG wśród populacji izraelskiej stwierdzili ich podwyższone miano u blisko 52 % badanych w grupie wiekowej 19 – 30 lat. Grupę badaną stanowiły osoby zdrowe bez objawów infekcji oddechowych. Jako metodę badawczą zastosowano MIF [132]. Podobne wyniki uzyskał Al-Younes badając pacjentów w Jordanii w przedziale wiekowym 20 – 29 lat, również nie wykazujących objawów infekcji oddechowych. Zaobserwował on podwyższone stężenie przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi u blisko 50 % badanych we wspomnianej grupie wiekowej. Podobnie jak w pracy Ben-Yaakova i wsp. w celu oznaczenia poziomu przeciwciał wykorzystano metodę MIF [133].

Z powyższymi pracami korespondują również wyniki Koh i wsp. przeprowadzone w Singapurze, którzy stwierdzili podwyższone miano przeciwciał anty-*C. pneumoniae* u 46,5 % badanych, w przedziale wiekowym 18 – 29 lat. Jako metodę badawczą również zastosowano MIF [134]. Tak znacząca różnica wyników między niniejszymi, a cytowanymi badaniami [132, 133, 134] może być konsekwencją większej rozpiętości wieku w analizowanych grupach wiekowych, a także wykorzystaniem różnych metod serodiagnostycznych (ELISA i MIF). Metody te różnią się nie tylko czułością i swoistością, ale również wykrywają odmienne przeciwciała, skierowane przeciwko odmiennym antygenom. W skutek tego nie można dokładnie porównać uzyskanych dzięki nim wyników. Mikroimmunofluorescencja jest metodą z wyboru, zalecaną przez CDC w serodiagnostyce zakażeń *C. pneumoniae* ze względu na wysoką czułość i specyficzność. Opierając się na badaniach Phoon i wsp. oraz Hermann i wsp. można przypuszczać, że zastosowana w niniejszej pracy metoda (ELISA) nie charakteryzuje się wystarczająco wysoką czułością oraz specyficznością w porównaniu z MIF [135, 136]. Obie te metody wymagają precyzji i dokładności wykonania, które to rzutują na ostateczny wynik badania. W metodzie MIF dodatkowo ważną rolę odgrywają umiejętności osoby wykonującej i analizującej oznaczenie. Jak dowodzą inne badania Hermann i wsp. wyniki uzyskane za pomocą metod ELISA i MIF korelują ze sobą i charakteryzują się dość zbliżoną czułością i specyficznością, przy czym ELISA jest testem szybszym i mniej obciążonym możliwością wystąpienia błędu laboratoryjnego wynikającego z subiektywnej oceny osoby oceniającej badanie [137].

W kontekście dość wysokiego odsetka populacji z podwyższonym stężeniem przeciwciał anty-*C. pneumoniae* w klasie IgG, wzrastającego wraz z wiekiem, oraz obrazu klinicznego infekcji wydawałoby się oczywiste wykrycie materiału genetycznego chlamydii w wymazach z gardła. Uzyskanie wyników ujemnych sugeruje wystąpienie błędu przedlaboratoryjnego lub laboratoryjnego. Możliwe jest, że pobrano zbyt mało materiału do badań lub w próbkach znajdowała się zbyt mała liczba kopii DNA *C. pneumoniae*, co uniemożliwiło jego detekcję. Możliwe też, że zastosowano nieodpowiednią metodę izolacji DNA lub wybrana metoda PCR nie była wystarczająco czuła i specyficzna [119, 138].

C. pneumoniae posiada unikatowy cykl rozwojowy. Jest to wewnątrzkomórkowy drobnoustrój odpowiedzialny głównie za infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych przebiegające bezobjawowo lub skąpoobjawowo, konsekwencją czego może być niewłaściwe leczenie bądź jego brak. Cechy te determinują zdolność *C. pneumoniae* do wywoływania zakażeń przewlekłych. Badania dowodzą, że mogą one stanowić istotny czynnik ryzyka rozwoju wielu chorób związanych z chronicznym stanem zapalnym o podłożu autoimmunologicznym. Jednak schorzenia te, takie jak niedokrwienność serca [139, 140], miażdżyca [141], choroby neurodegeneracyjne [142] czy astma [143], charakteryzują się złożoną, wieloczynnikową etiologią a *C. pneumoniae* stanowi tylko jeden z wielu czynników predysponujących do ich rozwoju. Powyższe badania ukazują jak trudna i złożona jest diagnostyka oraz interpretacja uzyskanych wyników w kontekście nosicielstwa oraz zakażeń *C. pneumoniae*, a co za tym idzie również ocena ryzyka wystąpienia powikłań związanych z zakażeniem tym patogenem. Określenie obecności DNA *C. pneumoniae* oraz miana przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi nie jest wystarczające. Wykrycie materiału genetycznego świadczy jedynie o aktualnej obecności tego mikroorganizmu w komórkach gospodarza, niekoniecznie o zakażeniu (możliwa bezobjawowa kolonizacja), z kolei podwyższone stężenie przeciwciał w klasie IgG sugeruje przebiecie infekcji. Niezbędne wydaje się natomiast oznaczenie miana przeciwciał w klasie IgA, których poziom wzrasta przy reinfekcjach, a to właśnie ich obecność predysponuje do rozwoju chronicznego stanu zapalnego i wystąpienia możliwych powikłań [144].

6. Wnioski

1. Nosicielstwo nosowe *S. aureus* stwierdzono u blisko 1/3 badanej grupy zdrowych, dorosłych osób, co koreluje z danymi europejskimi.
2. Nosiciele *S. aureus* w badanej grupie są skolonizowani przez szczepy MSSA charakteryzujące się dobrą wrażliwością na wszystkie grupy antybiotyków stosowanych rutynowo w leczeniu zakażeń gronkowcowych.
3. U szczepów *S. aureus* kolonizujących przedsionek jamy nosowej u bezobjawowych nosicieli występują wszystkie klasy specyficzności *agr*, przy czym najczęściej jest to grupa *agr I*.
4. Można przypuszczać, że polimorfizm *agr I* warunkuje obecność czynników ułatwiających gronkowcom złocistym rozprzestrzenianie się w środowisku i bezobjawową kolonizację gospodarza.
5. Obecność przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi stwierdzono u prawie 1/3 badanej populacji i jest to poziom niższy niż w porównywalnych grupach wiekowych w innych krajach.
6. Nie wykrycie obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z gardła w badanej grupie sugeruje konieczność podjęcia dalszych badań mających na celu ocenę nosicielstwa tego drobnoustroju.

7. Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Staphylococcus aureus to drobnoustrój wszechobecny w środowisku, zdolny do bezobjawowej kolonizacji błon śluzowych i skóry człowieka, ale mogący też być czynnikiem etiologicznym wielu poważnych schorzeń dotyczących różnych układów organizmu. Zakażenia gronkowcowe mogą mieć źródło zarówno szpitalne jak i środowiskowe. Wirulencja szczepów warunkowana jest między innymi szeroką gamą toksyn i enzymów, których produkcja kontrolowana jest przez globalne systemy regulacji genów. Nosicielstwo *S. aureus* jest uznanym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażeń tym drobnoustrojem.

Chlamydia pneumoniae to obligatoryjny patogen wewnątrzkomórkowy charakteryzujący się unikatowym cyklem rozwojowym. Ten atypowy drobnoustrój jest odpowiedzialny głównie za infekcje dróg oddechowych, jednak przewlekłe zakażenia mogą skutkować rozwojem chorób o podłożu auto-immunologicznym.

Ze względu na konsekwencje jakie może nieść ze sobą bezobjawowa kolonizacja tymi drobnoustrojami istotna jest ocena ich nosicielstwa.

Cele

1. Dokonanie oceny częstości występowania nosicielstwa *S. aureus* u zdrowych, dorosłych osób.
2. Ocena lekowrażliwości szczepów *S. aureus* izolowanych od zdrowych, dorosłych osób.
3. Ocena występowania grup specyficzności genów regulatorowych agr u szczepów *S. aureus* izolowanych od zdrowych, dorosłych osób.
4. Dokonanie oceny częstości występowania nosicielstwa *C. pneumoniae* u zdrowych, dorosłych osób.
5. Dokonanie oceny występowania przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w surowicy krwi u zdrowych, dorosłych osób.

Materiały i metody

Grupę badaną w ocenie nosicielstwa *S. aureus* w wymazach z przedsionka jamy nosowej oraz *C. pneumoniae* w wymazach z tylnej ściany gardła stanowiło 264 zdrowych, dorosłych ochotników, w wieku 19 – 25 lat. Ocenę miana przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG dokonano w próbkach surowicy krwi u 92 zdrowych, dorosłych ochotników wyłonionych z w/w grupy.

Metody wykorzystane w badaniach:

- Metody bakteriologiczne (hodowla, izolacja, identyfikacja biochemiczna drobnoustrojów oraz oznaczenie lekooporności metodą dyfuzyjno-krażkową);
- Metody molekularne (izolacja genomowego DNA drobnoustrojów, gatunkowo specyficzny PCR dla *S. aureus* oraz *C. pneumoniae*, PCR dla oznaczenia klas specyficzności agr);
- Metody immunoenzymatyczne (ELISA dla oznaczenia miana przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi).

Wyniki

W analizowanej grupie stwierdzono stałe nosicielstwo *S. aureus* u 28 % badanych. Wszystkie izolaty są szczepami MSSA, charakteryzują się też dobrą wrażliwością na trimetoprim/ sulfametoksazol oraz doksycyklinę. Większość izolatów należy do klasy specyficzności agr I.

Nie stwierdzono obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z tylnej ściany gardła u żadnego badanego ochotnika. Podwyższone miano przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi zaobserwowano u 28,3 % badanych, u 5,4 % wynik był wątpliwy.

Wnioski

1. Nosicielstwo nosowe *S. aureus* stwierdzono u blisko 1/3 badanej grupy zdrowych, dorosłych osób, co koreluje z danymi europejskimi.
2. Nosiciele *S. aureus* w badanej grupie są skolonizowani przez szczepy MSSA charakteryzujące się dobrą wrażliwością na wszystkie grupy antybiotyków stosowanych rutynowo w leczeniu zakażeń gronkowcowych.

3. U szczepów *S. aureus* kolonizujących przedstonki jamy nosowej u bezobjawowych nosicieli występują wszystkie klasy specyficzności *agr*, przy czym najczęściej jest to grupa *agr I*.
4. Można przypuszczać, że polimorfizm *agr I* warunkuje obecność czynników ułatwiających gronkowcom złocistym rozprzestrzenianie się w środowisku i bezobjawową kolonizację gospodarza.
5. Obecność przeciwciał anti-*C. pneumoniae* w klasie IgG w surowicy krwi stwierdzono u prawie 1/3 badanej populacji i jest to poziom niższy niż w porównywalnych grupach wiekowych w innych krajach.
6. Nie wykrycie obecności DNA *C. pneumoniae* w wymazach z gardła w badanej grupie sugeruje konieczność podjęcia dalszych badań mających na celu ocenę nosicielstwa tego drobnoustroju.

8. Streszczenie w języku angielskim/ Abstract

Introduction

Staphylococcus aureus is a ubiquitous microorganism, able to colonize human mucosa and skin asymptotically. It also could be the etiological factor of many several illnesses. Staphylococcal diseases may be acquired in a hospital or in community. The strains virulence is conditioned by a vast range of toxins and enzymes, whose production is controlled by the global genome regulatory systems. The carrier of *S. aureus* is a known risk factor of possible development of staphylococcal diseases.

Chlamydia pneumoniae is an obligate intracellular bacterium with a unique developmental cycle. This pathogen is mainly responsible for common respiratory tract infections, however the chronic chlamydial infections may result in development of autoimmune diseases.

The assessment of carrier of *S. aureus* and *C. pneumoniae* is important in view of potentially consequences of asymptotically colonization by these pathogens.

Goals

1. The assessment of the prevalence of carriers of *S. aureus* in healthy individuals.
2. The analysis of the susceptibility of *S. aureus* strains isolated from healthy individuals.
3. The assessment of the occurrence of *agr* regulatory gene specificity groups in *S. aureus* strains isolated from healthy individuals.
4. The assessment of the prevalence of carriers of *C. pneumoniae* in healthy individuals.
5. The assessment of the incidence of serum antibodies in IgG class against *C. pneumoniae* in healthy individuals.

Materials and methods

The study group in research for presence of *S. aureus* in the anterior nasal swabs and *C. pneumoniae* in the posterior throat wall swabs were 264 healthy adult individuals of 19 to 25 years. The evaluation of levels of antibodies anti-*C. pneumoniae* in IgG class was made in serum samples of 92 healthy adult volunteers.

Methods used in researches:

- Bacteriological (culture, isolation and biochemical identification of microorganisms, determination of susceptibility – disc diffusion method);
- Molecular (DNA isolation, PCR species-specific for *S. aureus* and *C. pneumoniae*, PCR for determination specificity group of global regulatory genes *agr*);
- Immunoenzimatic (ELISA to determine the level of serum anti-*C. pneumoniae* antibodies).

Results

Within the analyzed group of 264 healthy individuals, 28 % of subjects are carriers of *S. aureus*. Every isolated strain was methicillin-susceptible and sensitive to trimethoprim/ sulfamethoxazole. Most of them was also sensitive to doxycycline. Majority of isolated strains belong to *agr I* group specificity.

The DNA of *C. pneumoniae* in swabs from the back of the throat was not detected in any of the test volunteer. Elevated levels of serum antibodies anti-*C. pneumoniae* in IgG class were observed in 28.3 % of patients, in 5.4 % the result was doubtful.

Conclusions

1. The nasal carriage of *S. aureus* was found in nearly 1/3 of the examined group of healthy adults and it correlates with other European data.
2. All isolated strains of *S. aureus* derived from the carriers are MSSA. This strains characterized by good sensitivity to other groups antibiotics used routinely in treatment staphylococcal infections.

3. In *S. aureus* strains isolated from healthy individuals there are all class of specificity *agr* but the most common is class *agr I*.
4. We can assume, that polymorphism *agr I* determines the presence of factors facilitating the spread of *S. aureus* in the environment and asymptomatic colonization of the host.
5. Anti-*C. pneumoniae* antibodies in IgG class in the blood serum occurred in almost 1/3 of the examined group of healthy adults and it is lower than in comparable age groups in the other countries.
6. Failure to detect the presence of *C. pneumoniae* DNA in throat swabs in analyzed group of healthy individuals suggests to need for further studies to assess the carrier of *C. pneumoniae*.

9. Spis tabel, rycin i wykresów

9.1. Spis tabel

Tabela 3-1. Antybiotyki wykorzystane w określeniu lekowrażliwości izolatów <i>S. aureus</i>	47
Tabela 3-2. Składniki mieszaniny reakcyjnej gatunkowo-specyficznego PCR dla <i>S. aureus</i>	52
Tabela 3-3. Składniki mieszaniny reakcyjnej PCR reakcji określającej klasy specyficzności genów regulatorowych <i>agr</i>	53
Tabela 3-4. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR-OUT dla <i>C. pneumoniae</i> . 54	
Tabela 3-5. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR-IN dla <i>C. pneumoniae</i>	55
Tabela 4-1. Liczba badanych i nosicieli z podziałem na płeć.....	59
Tabela 4-2. Lekooporność wyizolowanych szczepów <i>S. aureus</i>	60
Tabela 4-3. Podział szczepów <i>S. aureus</i> na klasy specyficzności genów regulatorowych <i>agr</i>	62
Tabela 4-4. Ocena istotności różnic częstości występowania poszczególnych klas specyficzności genów regulatorowych <i>agr</i>	62

9.2. Spis rycin

Rycina 1.1. <i>S. aureus</i> w preparacie z podłoża stałego barwionym metodą Grama .	11
Rycina 1.2. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich	13
Rycina 1.3. Odpowiedź wybranych komórek na intoksykację toksyną alfa, zależna od stężenia toksyny.	14
Rycina 1.4. Pacjent z czyrakiem wywołanym przez <i>S. aureus</i> MSSA, który zgłosił się na badanie do Pracowni Usługowej Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.	20
Rycina 1.5. Stadia rozwoju biofilmu	22
Rycina 1.6. Schemat locus <i>agr</i> <i>S. aureus</i> i jego mapa funkcjonalna	25

Rycina 1.7. Hodowla <i>S. aureus</i> na podłożu z 5 % krwią baranią z widoczną strefą beta hemolizy.	26
Rycina 1.8. Hodowla <i>S. aureus</i> na podłożu wybiórczo-różnicującym Chapmana.....	27
Rycina 1.9. Próba na koagulazę wolną, metoda probówkowa.....	28
Rycina 1.10. Cykl rozwojowy <i>Chlamydia pneumoniae</i>	32
Rycina 1.11. Szacunkowy odsetek osób z podwyższonym stężeniem przeciwciał anty- <i>C. pneumoniae</i> w klasie IgG w surowicy krwi, w poszczególnych grupach wiekowych.	33
Rycina 1.12. Dynamika narastania stężenia przeciwciał przeciwko <i>C. pneumoniae</i> w klasie IgM w surowicy krwi w czasie	37
Rycina 1.13. Dynamika narastania stężenia przeciwciał przeciwko <i>C. pneumoniae</i> w klasie IgG w surowicy krwi w czasie.....	38
Rycina 3.1. Hodowla ziarniaków Gram dodatnich, pochodzących od badanych osób, na podłożu Chapmana.....	45
Rycina 3.2. Odczyt automatyczny testu biochemicznego STAPYtest24 w programie TNW Pro Auto 6.5.	46
Rycina 3.3. Czytnik mikroplitek Reader 250 (bioMérieux).	56
Rycina 3.4. Zestaw diagnostyczny ELISA <i>Chlamydia pneumoniae</i> IgG ELISA firmy Demeditec Diagnostics GmbH.....	57
Rycina 4.1. Analiza elektroforetyczna reakcji PCR dla genów regulatorowych <i>agr</i> klasy I i II.....	61
Rycina 4.2. Analiza elektroforetyczna reakcji PCR dla genów regulatorowych <i>agr</i> klasy III i IV..	61
Rycina 4.3. Analiza elektroforetyczna reakcji PCR dla <i>C. pneumoniae</i>	63

9.3. Spis wykresów

Wykres 4-1. Procentowy rozkład stężeń przeciwciał anty- <i>C. pneumoniae</i> w klasie IgG w surowicy krwi w badanej grupie.....	64
---	----

10. Literatura

1. Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F et al.: Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014; 12: 75-89.
2. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A et al.: Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*. 2004; 364: 703-705.
3. Johannessen M, Sollid JE, Hanssen AM: Host and microbe determinants that may influence the success of *Staphylococcus aureus* colonization. *Front Cell Inf Microbiol*. 2012; 2: 56.
4. Jama-Kmiecik A, Choroszy-Król I: Rola *Chlamydomphila pneumoniae* w astmie oskrzelowej i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc – mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. *Adv Clin Exp Med*. 2007; 16(1): 113-121.
5. Krenke R: Zakażenia górnych dróg oddechowych – wywołane przez drobnoustroje atypowe. *Mag Otolaryngol*. 2006. ISSN 1643-0050.
6. Szewczyk EM: Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa 2013; s.20-45, 227-233.
7. Szkaradkiewicz A: Mikrobiologia lekarska. Repetytorium z bakteriologii. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. 2011.
8. Bailey RG, Turner RD, Mullin N, Clarke N et al.: The interplay between cell wall mechanical properties and the cell cycle in *Staphylococcus aureus*. *Biophys J*. 2014; 107: 2538-2545.
9. Frankel MB, Schneewind O: Determinants of murein hydrolase targeting to cross-wall of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J Biol Chem*. 2012; 287(13): 10460-10471.
10. Winstel V, Kühner P, Salomon F, Larsen J et al.: Wall teicholic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *mBio*. 2015; 6(4): E00632-15.
11. Parker D, Prince A: Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infections. *Semin Immunopathol*. 2012; 34(2): 281-297.

12. Vontiseva A, Fung R, Miller R, Knox K et al.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. BMC Microbiology. 2014; 14: 63.
13. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Mikrobiologia Lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2007; s.145.
14. Gar-Yun Chan Y, Keun Kim H, Schneewind O, Missakias D: The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes. J Biol Chem. 2014; 289(22): 15680-15690.
15. Huseby M, Shi K, Brown K, Digre J et al.: Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2007; 189(23): 8719-8726.
16. Anderson MJ, Lin Y, Gillman AN, Parks PJ et al.: Alpha-toxin promotes *Staphylococcus aureus* mucosal biofilm formation. Front Cell Inf Microbiol. 2012; 2: 64.
17. Otto M: *Staphylococcus aureus* toxins. Curr Opin Microbiol. 2014; 17(0): 32-37.
18. Vandenesch F, Lina G, Henry T: *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane damaging virulence factors. Front Cell Inf Microbiol. 2012; 2(12): DOI: 10.3389/fcimb.2012.00012
19. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J: *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. Toxins. 2013; 5: 1140-1166.
20. Salgado-Pabon W, Herrera A, Vu BG, Stach CS et al.: *Staphylococcus aureus* β -toxin production is common in strains with the β -toxin gene inactivated by bacteriophage. J Infect Dis. 2014; 210: 784-792.
21. Cheung GYC, Otto M: The potential use of toxin antibodies as a strategy for controlling acute *Staphylococcus aureus* infections. Expert Opin Ther Targets. 2012; 16(6): 601-612.
22. Yoong P, Pier GB: Immune-activating properties of Panton-Valentine leukocidin improve the outcome in a model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. Infect Immun. 2012; 80(8): 2894-2904.
23. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G: Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins. 2010; 2: 1148-1165.

24. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M et al.: The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2011; 2(6): 580-592.
25. Ou J, Wang J, Xu Y, Tao Z et al.: *Staphylococcus aureus* superantigens are associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014; DOI: 10.1007/s00405-014-2955-0.
26. Cheng AG, DeDent AC, Schneewind O, Missiakas D: A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol*. 2011; 19(5): 225-232.
27. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(3): 505-520.
28. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA et al.: Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis*. 2009; 199: 1820-1826.
29. Chudzicka-Strugała I, Karpiński TM, Sikora A, Zeidler A, Szkaradkiewicz A: Slime production and *agr* genes expression in *S. aureus* strains isolated from healthy students in Poland. *25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25-28 April 2015*. Copenhagen, Denmark (2015). abstr. EV0345.
30. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W et al.: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5: 751-762.
31. Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH et al.: Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *Staphylococcus aureus* carriage. *Cell Host Microbe*. 2013; 14(6): 631-640.
32. Sollid JU, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M: *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol*. 2014; 21: 531-541.
33. van Belkum A, Emonts M, Wertheim H, de Jongh C et al.: The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*. 2007; 9: 1471-1477.
34. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM et al.: Nasal colonization by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the

- squamous epithelial cell envelope protein loricrin. PLoS Pathog. 2012; 8(12): e1003092.
35. Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C: *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. Trends Microbiol. 2012; 20: 243-250.
 36. Lamers RP, Stinnet JW, Mathurishnan G, Parkinson CL et al.: Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. PLoS One. 2011; 6: e16426.
 37. Liu CM, Price LB, Hungate BA, Abraham AG et al.: *Staphylococcus aureus* and the ecology of nasal microbiome. Sci Adv. 2015; 1: e1400216.
 38. Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS et al.: The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. PLoS One. 2010; 5: e10598.
 39. Gordon RJ, Lowy FD: Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2008; 46(5): S350-S359.
 40. Rigby Km, DeLeo FR: Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. Semin Immunopathol. 2012; 34: 237-259.
 41. Williamson DA, Lim A, Thomas MG, Baker MG et al.: Incidence, trends and demographics of *Staphylococcus aureus* infections in Auckland, New Zealand, 2001-2011. BMC Infectious Disease. 2013; 13: 569.
 42. Andrey DO, Renzoni A, Monod A, Lew DP et al.: Control of the *Staphylococcus aureus* toxic shock *tst* promoter by the global regulator SarA. J Bacteriol. 2010; 192(22): 6077-6085.
 43. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG et al.: *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties, regulation and roles in human disease. Virulence. 2011; 2(5): 445-459.
 44. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D et al.: Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol. 2004; 186(14): 4665-4684.
 45. Boles BR, Horswill AR: Staphylococcal biofilm disassembly. Trends Microbiol. 2011; 19(9): 449-455.
 46. Le KY, Dastghyeb S, Ho TV, Otto M: Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4: 167.
 47. Novick RP: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol. 2003; 48(6): 1429-1449.

48. Plata KB, Rosato RR, Rosato AE: Fate of mutation rate depends on *agr* locus expression during oxacillin-mediated heterogeneous-homogeneous selection in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(7): 3176-3186.
49. Surette MG, Miller MB, Bassler BL: Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 1639-1644.
50. Geisinger E, George EA, Muir TW, Novic RP: Identification of ligand specificity determinants in *AgrC*, the *Staphylococcus aureus* quorum-sensing receptor. *J Biol Chem.* 2008; 283(14): 8930-8938.
51. Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H et al.: Structure-activity of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 1218-1223.
52. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T et al.: High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol.* 2002; 184(4): 1180-1186.
53. Kretschmer D, Nikola N, Dürr M, Otto M, Peschel A: The virulence regulator *Agr* controls the staphylococcal capacity to activate human neutrophils via the formyl peptide receptor 2. *J Innate Immun.* 2011; 4: 201-212.
54. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AMS, Lina G et al.: Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000; 182(22): 6517-6522.
55. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A et al.: Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2010; 9: 23.
56. Chambers HF, DeLeo FR: Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(9): 629-641.
57. Żabicka D, Hryniewicz W: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2010. Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus* spp. KORDL 2010.
58. Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A: Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration

- of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(7): 794-804.
59. Chatterjee SS, Otto M: Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* waves. *Clinical Epidemiology.* 2013; 5: 205-217.
 60. Tong SYC, Chen LF, Fowler VG: Colonization, pathogenicity, host susceptibility and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol.* 2012; 34(2): 185-200.
 61. Krzysztoń-Russjan J, Hryniewicz W: Pierwsze izolaty MRSA w Polsce o obniżonej wrażliwości na wankomycynę. Raport Krajowego Ośrodka ds. Lekowrażliwości. Warszawa, 2001.
 62. Müller N, Sattelmacher F, Lugert R, Groß U: Characterization and intracellular localization of putative *Chlamydia pneumoniae* effector proteins. *Med Microbiol Immunol.* 2008; 197: 387-396.
 63. Miura K, Toh H, Hirakawa H, Suggi M et al.: Genome-wide analysis of *Chlamydophila pneumoniae* gene expression at the late stage of infection. *DNA Res.* 2008;15: 83-91.
 64. Moelleken K, Hegemann JH: The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosamino-glycan binding. *Mol Microbiol.* 2008; 67(2): 403-419.
 65. Marino J, Stoeckli I, Walch M, Latinovic-Golic S et al.: *Chlamydophila pneumoniae* derived from inclusions late in the infectious cycle induce apoptosis in human aortic endothelial cells. *BMC Microbiology.* 2008; 8: 32.
 66. Contini C, Seraceni S, Cultera R, Castellazzi M et al.: *Chlamydophila pneumoniae* infection and its role in neurological disorders. *Interdisc Perspect Infect Dis.* 2010; DOI: 10.1155/2010/273573.
 67. Hammond CJ, Hallock LR, Howanski RJ, Appelt DM et al.: Immunohistological detection of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's disease brain. *BMC Neuroscience.* 2010; 11: 121.
 68. Rajalingam K, Al-Younes H, Müller A, Meyer TF et al.: Epithelial Cells Infected with *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) Are Resistant to Apoptosis. *Infect Immun.* 2001; 69 (12): 7880-7888.
 69. Kuo CC, Jackson L, Campbell LA, Grayston JT: *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8(4): 451-461.

70. Blasi F, Tarsia P, Arosio C, Fagetti L et al.: Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 1988; 4: 4S1-6.
71. Chen Z, Ji W, Wang Y, Yan Y et al.: Epidemiology and associations with climatic conditions of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* infections among Chinese children hospitalized with acute respiratory infections. Ital J Pediatr. 2013; 39: 34.
72. Choroszy-Król I, Frej-Mądrzak M, Hober M, Sarowska J et al.: Infections caused by *Chlamydophila pneumoniae*. Adv Clin Exp Med. 2014; 23(1): 123-126.
73. Kumar S, Hammerschlag MR: Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2007; 44: 568-576.
74. Conklin L, Adjemian J, Loo J, Mandal S et al.: Investigation of a *Chlamydia pneumoniae* outbreak in a federal correctional facility in Texas. Clin Infect Dis. 2013; 57(5): 639-647.
75. Yazouli LE, Hejaji H, Elmdaghri N, Alami AA et al.: Investigation of *Chlamydia pneumoniae* infection in Moroccan patients suffering from cardiovascular diseases. Journal of Infection and Public Health. 2018; 11: 246-249.
76. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S: *Chlamydophila pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009; 15: 29-35.
77. Igusa R, Nakamura A, Kawana S, Shibahara T et al.: Two cases of acute respiratory distress syndrome with high values of *Chlamydophila pneumoniae*-specific antibodies. Intern Med. 2013; 52: 2789-2793.
78. Kern JM, Maass V, Maass M: *Chlamydia pneumoniae* – induced pathological signaling in the vasculature. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 55: 131-139.
79. Hahn DL, Dodge RW, Golubjatnikov R: Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. JAMA. 1991; 266: 225-230.
80. Yamaguchi H, Haranaga S, Widen R, Friedman H et al.: *Chlamydia pneumoniae* infection induces differentiation of monocytes into macrophages. Infect Immun. 2002; 70(5): 2392-2398.

81. Summersgill JT, Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA: Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with endothelial cells. J Infect Dis. 2000; 181(3): S479-482.
82. Derfuss T, Gürkov R, Then Bergh F, Goebels N et al.: Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. Brain. 2001; 124: 1325-1335.
83. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM et al.: Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the centers for disease control and prevention (USA) and the laboratory centre for disease control (Canada). Clin Infect Dis. 2001; 33(4): 492-503.
84. Elkind MS, Tondella ML, Feikin DR, Fields BS et al.: Seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* is associated with risk of first ischemic stroke. Stroke. 2006; 37(3): 790-795.
85. Miyashita N, Kawai Y, Tanaka T, Akaike H et al.: Antibody responses of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia: Why is the diagnosis of *C. pneumoniae* pneumonia difficult? J Infect Chemother. 2015; 21: 497-501.
86. Hryniewicz W, Ozorowski T, Radzikowski A, Zielonka T et al.: Rekomendacje postępowania w pozaszpitalnych zakażeniach układu oddechowego. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków. 2010; s.90.
87. Hvidsten D, Halvorsen DS, Berdal BP, Gutteberg TJ: *Chlamydia pneumoniae* diagnostic: importance of methodology in relations to timing of sampling. Clin Microbiol Infect. 2009; 15: 42-49.
88. Herrera M, Aguilar YA, Rueda ZV, Muskus C, Vélez LA: Comparison of serological methods with PCR-based methods for the diagnosis of community-acquired pneumonia caused by atypical bacteria. Journal of Negative Results in BioMedicine. 2016; 15: 3.
89. Chotikanatis K, Kohlohoff SA, Hammerschlag MR: *In vitro* Activity of Nemonoxacin, a Novel Nonfluorinated Quinolone Antibiotic, against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(3): 1800-1801.
90. Webley WC, Hahn DL: Infection-mediated asthma: etiology, mechanisms and treatment options, with focus on *Chlamydia pneumoniae* and macrolides. Respiratory Research. 2017; 18: 98.

91. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Maraki S et al.: *Staphylococcus aureus* nasal carriage might be associated with vitamin D receptor polymorphisms in type 1 diabetes. *Int J Infect Dis.* 2009; 13: e437-443.
92. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>.
93. Słomski R: Ilościowa i jakościowa ocena preparatów DNA i RNA, Analiza DNA. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Poznań 2011; s.61-63.
94. Martín-López JV, Díez-Gil O, Morales M, Batista N et al.: Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *Int Microbiol.* 2004; 7: 63-66.
95. Shopsisin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B et al.: Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 456–459.
96. Akmatov MK, Mehraj J, Gatzemeier A, Strömpl J et al.: Serial home-based self-collection of the anterior nasal swabs to detect *Staphylococcus aureus* in randomized population-based study in German. *Int J Infect Dis.* 2014; 25: 4-10.
97. Gamblin J, Jefferies JM, Harris S, Ahmad N et al.: Nasal self-swabbing for estimating the prevalence of *Staphylococcus aureus* in the community. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 437-440.
98. Andersen PS, Pedersen JK, Fode P, Skov R et al.: Influence of host genetics and environment on nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Danish middle-aged and elderly twins. *J Infect Dis.* 2012; 206: 1178-1184.
99. Mehraj J, Akmatov MK, Strömpl J, Gatzemeier A et al.: Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in Northern Germany. *PLoS ONE.* 2014; 9(9): e107937.
100. Köck P, Werner A, Friedrich W, Fegeler C et al.: Persistence of nasal colonization with human pathogenic bacteria and associated antimicrobial resistance in the German general population. *New Microbe and New Infect.* 2015; 9: 24-34.

101. Esposito S, Terranova L, Zampiero A, Ierardi V et al.: Oropharyngeal and nasal *Staphylococcus aureus* carriage by healthy children. BMC Infectious Diseases. 2014; 14: 723.
102. Bischoff WE, Wallis ML, Tucker KB, Reboussin BA, Sheretz RJ: *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community prevalence, clonal relationships, and risk factors. Infect Control. 2004; 25(6): pp485-491.
103. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G et al.: Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States. J Infect Dis. 2008; 197: 1226-1234.
104. Chen B, Dai X, He B, Pan K et al.: Differences in *Staphylococcus aureus* nasal carriage and molecular characteristics among community residents and healthcare workers at Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Southern China. BMC Infectious Diseases. 2015; 15: 303.
105. Fard-Mousavi N, Mosayebi G, Amouzandeh-Nobaveh A, Japouni-Nejad A et al.: The dynamic of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ccentral Iran. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(7): e20760.
106. Steiner Z, Natan OB, Sukhotnik I, Coran, Keren G: Does *Staphylococcus aureus* nasal carriage require eradication prior to elective ambulatory surgery in children? Pediatr Surg Int. 2014; 30(5): 521-525.
107. Sharma Y, Jain S, Singh H, Govil V: *Staphylococcus aureus*: screening for nasal carriers in a community setting with special reference to MRSA. Scientifica (Cairo). 2014; 2014: 479048.
108. Okamo B, Moremi N, Seni J, Mirambo MM et al.: Prevalence and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* nasal carriage among pre-clinical and clinical medical students in Tanzanian University. BMC Research Notes. 2016; 9:47.
109. Aiken AM, Mutuku IM, Sabat AJ, Akkerboom V et al.: Carriage of *Staphylococcus aureus* in Thika Level 5 Hospital, Kenya: a cross-sectional study. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2014; 3: 22.
110. Lall LCM, Sahni BAK: Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. Med J Armed Forces India. 2014; 70: 43-47.
111. Aamot HV, Stavem K, Skræmm I: No change in the distribution of types and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from

- orthopaedic patients during a period of 12 years. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(9): 1833-1837.
112. Garbacz K, Piechowicz L, Wiśniewska K, Dąbrowska-Szponar M: Zróżnicowanie locus *agr* wśród *Staphylococcus aureus* izolowanych od nosicieli oraz od chorych z objawami zakażenia. Med Dosw Mikrobiol. 2009; 61: 5-9.
113. Collery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC et al.: Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. J Med Microbiol. 2008; 57: 348-358.
114. van Leeuwen W, van Nieuwenhuizen W, Gijzen C, Verbrugh H, van Belkum A: Population studies of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a staphylococcal autoinducer peptide. J Bacteriol. 2000; 182(20): 5721-5629.
115. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G et al.: Relationship between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (allels), and human disease. Infect Immun. 2002; 70(2): 631-641.
116. Yoon HJ, Choi JJ, Lee K, Yong D et al.: Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. Yonsei Med J. 2007; 48(2): pp176-183.
117. Mahony JB, Chong S, Coombes BK, Smieja M et al.: Analytical sensitivity, reproducibility of results, and clinical performance of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells. J Clin Microbiol. 2000; 38(7): p2622-2627.
118. Karpiński TM, Sikora A, Ronij A, Sak M et al.: Manifestation of serum anti-*Chlamydia pneumoniae* antibodies in healthy adults. Probl Hig Epidemiol. 2015; 96(1): 120-123.
119. Min-Chul C, Hyewon K, Dongheui A, Miyoung L et al.: Comparison of Sputum and Nosopharyngeal Swab Specimens for Molecular Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. Ann Lab Med. 2012; 33: 133-138.

120. Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SC, Mousavi Joulandan SA et al.: Evaluation of PCR, Culture, and Serology for Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* Respiratory Infections. J Clin Microbiol. 1998; 36(8): 2301-2307.
121. Mygind T, Birkelund S, Birkebæk NH, Østergaard L et al.: Determination of PCR efficiency in chelex-100 purified clinical samples and comparison of real-time quantitative PCR and conventional PCR for detection of *Chlamydia pneumoniae*. BMC Microbiology. 2002; 2: 17.
122. Sidal M, Kilic A, Unuvar E, Oguz F et al.: Frequency of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Children. J Trop Pediatr. 2007; 53(4): 225-231.
123. Bielicka A, Zielnik-Jurkiewicz B, Podsiadły E, Rogulska J, Demkow U: *Chlamydia pneumoniae* and typical bacteria occurrence in adenoid in children qualified for adenoidectomy. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2014; 78: 828-831.
124. Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H, Wettergren B: Chlamydia pneumoniae in children attending day-care centers in Gävle, Sweden. Pediatr Infect Dis J. 1998; 17(6): 474-478.
125. Apfalter P, Blasi F, Boman J, Gaydos CA et al.: Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. J Clin Microbiol. 2001; 39(2): p519-524.
126. Fukano H: Comparison of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA. Microbiol Immunol. 2004; 48(6): 441-448.
127. Smieja M, Mahony JB, Goldsmith CH, Chong S et al.: Replicate PCR testing and probit analysis for detection and quantitation of *Chlamydia pneumoniae* in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2001; 39(5): p1796-1801.
128. Apfalter P, Assadian O, Blasi F, Boman J et al.: Reliability of Nested PCR for Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Atheromas: Results from a Multicenter Study Applying Standardized Protocols. J Clin Microbiol. 2002; 40(12): 4428-4434.
129. Apfalter P, Barousch W, Nehr M, Makristathis A et al.: Comparison of a New Quantitative *ompA*-Based Real-Time PCR TaqMan Assay for Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Respiratory Specimens with Four Conventional PCR Assays. J Clin Microbiol. 2003; 41 (2): 592-600.

130. Murdoch DR: Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *APMIS*. 2004; 112: 713-727.
131. Benitez AJ, Thurman KA, Diaz MH, Conklin L et al.: Comparison of Real-Time PCR and a Microimmunofluorescence Serological Assay for Detection of *Chlamydophila pneumoniae* Infection in an Outbreak Investigation. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(1): 151-153.
132. Ben-Yaakov M, Eshel G, Zaksonski L, Lazarovich Z et al.: Prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in an Israeli population without clinical evidence of respiratory infection. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 355-358.
133. Al-Younes HM: High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in an asymptomatic Jordanian population. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014, 47: 412-417.
134. Koh WP, Taylor MB, Hughes K, Chew SK et al.: Seroprevalence of IgG antibodies against *Chlamydia pneumoniae* in Chinese, Malays and Asian Indians in Singapore. *Int J Epidemiol*. 2002; 31: 1001-1007.
135. Phoon MC, Yee GW, Koh WP, Chow WT: Comparative sero-epidemiologic analysis of *Chlamydophila pneumoniae* infection using microimmunofluorescence, enzyme immunoassay and neutralization test: implications for serodiagnosis. *Indian J Microbiol*. 2011; 51(2): 223-229.
136. Hermann C, Graf K, Groh A, Straube E, Hartung T: Comparison of Eleven Commercial Tests for *Chlamydia pneumoniae* – Specific Immunoglobulin G in Asymptomatic Healthy Individuals. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(5): 1603-1609.
137. Hermann C, Gueinzius K, Oehme A, von Aulock S et al.: Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against *Chlamydophila pneumoniae* to a micro-immunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(6): 2476-2479.
138. Wellinghausen N, Straube E, Freidank H, von Baum H et al.: Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *Int J Med Microbiol*. 2006; 296: 485-491.
139. Chen J, Zhu M, Ma G, Zhao Z et al.: *Chlamydia pneumoniae* infection and cerebrovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *BCM Neurology*. 2013; 13: 183.

140. Kēnina V, Auce P, Priede Z, Millers A: The Relationship Between Seropositivity Against *Chlamydia pneumoniae* and Stroke and its Subtypes in a Latvian Population. *Medicina (Kaunas)*. 2011; 47(12): 657-660.
141. Di Pietro M, Filardo S, De Santis F, Sessa R: *Chlamydia pneumoniae* infection in atherosclerotic lesion development through oxidative stress: a brief overview. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 15105-15120.
142. Dreses-Werringloer U, Bhuiyan M, Zhao Y, Gerard HC et al.: Initial characterization of *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* cultured from the late-onset Alzheimer brain. *Int J Med Microbiol*. 2009; 299(3): 187-201.
143. Specjalski K: Rola zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu astmy. *Pneumonol Alergol Pol*. 2010; 78(4): 284-295.
144. Elkind MSV, Lin I, Grayston JT, Sacco RL: *Chlamydia pneumoniae* and the Risk of First Ischemic Stroke. The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*. 2000; 31: 1521-1525.

Załącznik nr 1.



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 146/14

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłoszenia niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczenia opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 13 lutego 2014 r.
rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

Miejsce prowadzenia badań:

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej UM w Poznaniu

Główny badacz: mgr Agata Sikora

Członkowie zespołu

badawczego:

prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

dr hab. Tomasz M. Karpiński

dr Izabela Chudzińska-Strugała

dr Agnieszka Zeidler

Temat badań:

„Ocena występowania nosicielstwa *Staphylococcus aureus* i *Chlamydia pneumoniae* w jamie nosowo-gardłowej u zdrowych dorosłych osób”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

UNIwersytet Medyczny
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
WYDZIAŁ LEKARSKI II
DEKANAT
60-012 Poznań, ul. Bukowska 70, II ptr., D-2
tel. 061 8547 131; 132, fax 061 8547 133
http://www.ump.edu.pl

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

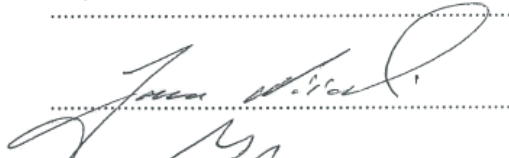
13.05.2015

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 146/14 z dnia 13.02.2014r.

prof. dr hab. PAWEŁ CHĘCIŃSKI



prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI



prof. dr hab. ZYGMUNT ADAMSKI



dr KRYSTYNA BABIAK



dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM



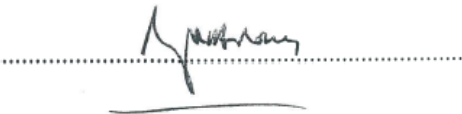
mgr JOLANTA ŁOJKO-KOŁODZIEJCZAK



mgr KRYSTYNA MALINGER



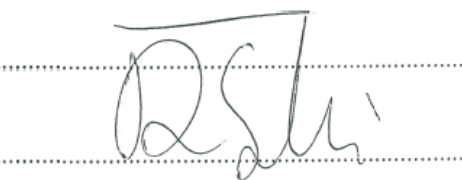
prof. dr hab. ANDRZEJ MARSZAŁEK



prof. dr hab. MACIEJ OWECKI



prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI



dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM



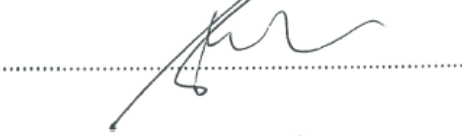
dr med. PIOTR TOMCZAK



prof. dr hab. JOANNA TWAROWSKA-HAUSER



ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA



prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

UNIWERSYTET MEDYCZNY
... Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
WYDZIAŁ LEKARSKI II
DZIEKAMAT
60-612 Poznań, ul. Bukowska 70, II piętro, D-2
tel. 061 8547 131; 132, fax 061 8547 133
<http://www.ump.edu.pl>

146/14
11.05.2015r.

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

z dnia13.02.2014r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Okręgowa Izba Radców Prawnych w Poznaniu, ul. Chwaliszewo 69, Poznań
5.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UM, ul. Polna 33, Poznań
8.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Zakład Patologii Nowotworów UM ul. Garbary 15, Poznań
9.	prof. dr hab. n. med. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
10.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
11.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Szamarzewskiego 82/84, Poznań
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UM, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań

UNIWERSYTET MEDYCZNY
 Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
WYDZIAŁ LEKARSKI II
DZIEKANAT
 60-812 Poznań, ul. Bukowska 70, II ptr., D-2
 tel. 061 8547 131; 132, fax 061 8547 133
<http://www.ump.edu.pl>

Opinię z wyrażeniem

data 13.02.2014r. 