

Received: 2010.12.17
Accepted: 2011.01.21
Published: 2011.02.16

Zakażenia pałeczkami jelitowymi – diagnostyka, oporność na antybiotyki i profilaktyka

Enterobacteriaceae infection – diagnosis, antibiotic resistance and prevention

Anna Jarzab, Sabina Górska-Frączek, Jacek Rybka, Danuta Witkowska

Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Zakażenia pałeczkami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae* są jednym z poważniejszych problemów współczesnego społeczeństwa. Chociaż niektóre gatunki obecne w przewodzie pokarmowym człowieka nie wywołują objawów chorobowych, to znaczna część tej rodziny została uznana za ważne patogeny. Szczepy z rodzajów *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* czy *Yersinia*, są bezpośrednią przyczyną biegunek, czerwonki bakteryjnej, duru brzuszego i innych schorzeń jelitowych, a także zakażeń układu moczowo-płciowego, czy krwionośnego. Według WHO na 4,5 miliarda przypadków zachorowań, zatrucia pokarmowe są przyczyną śmierci 1,9 mln osób rocznie i pod względem śmiertelności zajmują trzecie miejsce wśród chorób trapiących ludzi na całym świecie. W pracy omówiono wybrane zagadnienia dotyczące metod identyfikacji czynnika etiologicznego zakażeń, mechanizmu wnikania bakterii i zakażenia organizmu gospodarza oraz charakteru wzbudzonej odpowiedzi układu odpornościowego. Opisano mechanizmy lekooporności pałeczek jelitowych oraz możliwości leczenia i zapobiegania zakażeniom przez doskonalenie metod detekcji, konstruowanie szczepionek i zastosowanie szczepień ochronnych. Szczególną uwagę zwrócono na białko OMP38 wyizolowane ze ściany komórkowej *S. flexneri* 3a, które dzięki zdolności do wzbudzania odpowiedzi komórkowej i humoralnej jest potencjalnym antygenem lub nośnikiem do szczepionki koniugatowej.

Słowa kluczowe:

Enterobacteriaceae • zakażenia jelitowe • *Shigella* • oporność na antybiotyki • białka błony zewnętrznej • odporność • szczepionka

Summary

Intestinal infections caused by rod-shaped bacteria of the *Enterobacteriaceae* genus are one of the major health hazards in countries where sanitation standards are low. Strains of *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* and *Yersinia* are responsible for diarrhea, severe bacillary dysentery, typhoid, other intestinal diseases, as well as genitourinary tract and blood infections. According to the WHO there are 4.5 billion cases every year, of which 1.9 million end in death. This makes intestinal infections third in terms of human disease mortality. In this work we discuss methods of pathogen identification, the mechanism of host-pathogen interaction, and the nature of the host's immunological response. Due to rising drug resistance we discuss the importance of better pathogen detection, vaccine design and the use of vaccines as a preventive measure against intestinal infections. Special attention is paid to OMP38, a protein isolated from *S. flexneri* 3a outer membrane. Since it is known that this protein has good immunogenic properties, it can be used as an antigen or carrier for conjugate vaccines.

Key words:

Enterobacteriaceae • intestinal infection • *Shigella* • antibiotic resistance • OMP • immunity • vaccine

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=933273>

Word count: 9687

Tables: –

Figures: 4

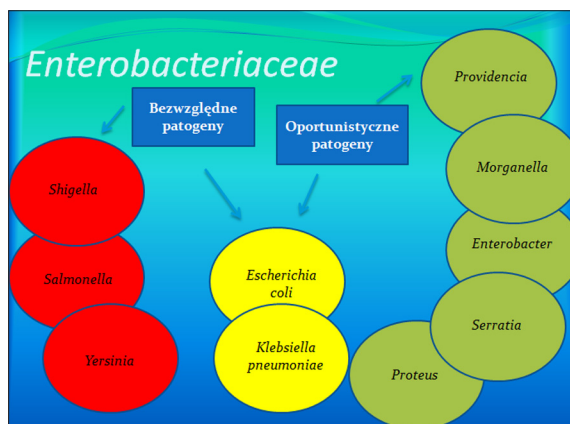
References: 154

Adres autorki: dr hab. Danuta Witkowska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: witkows@iidt.pan.wroc.pl

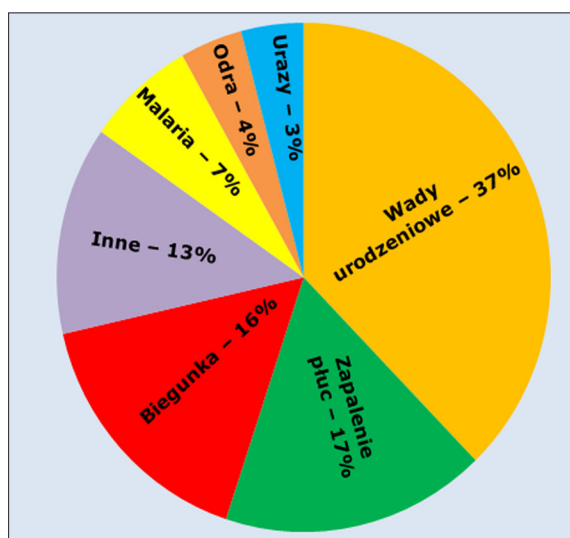
RODZINA *ENTEROBACTERIACEAE*

Mikroflorę przewodu pokarmowego człowieka tworzy około 400–500 gatunków różnorodnych mikroorganizmów. Szacuje się, że w organizmie dorosłego osobnika na każdy gram treści jelitowej przypada około 10^{11} – 10^{12} mikroorganizmów, co sugeruje, że drobnoustroje stanowią około 1 kg masy ludzkiego ciała [16]. Florę bakteryjną przewodu pokarmowego u ludzi stanowią zarówno drobnoustroje, korzystnie wpływające na zdrowie gospodarza, jak i szkodliwe patogeny. Zachwianie równowagi między liczbą występujących mikroorganizmów należących do obydwu tych grup, może prowadzić do wielu poważnych schorzeń [38]. Drobnoustroje należące do rodziny *Enterobacteriaceae* tworzą dużą grupę bakterii, podobnych pod względem morfologicznym i fizjologicznym. Wykazują one również duże podobieństwo pod względem cech antygenowych i genetycznych [77]. *Enterobacteriaceae*, a zwłaszcza tolerujące tlen gatunki *E. coli*, są uważane za jedną z najbardziej charakterystycznych grup zasiedlających przewód pokarmowy człowieka, mimo że pod względem liczebności nie stanowią w nim przeważającej większości. Innymi przedstawicielami tej rodziny, obecnymi w układzie pokarmowym są gatunki z rodzaju: *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella*, będące również fakultatywnymi beztlenowcami [30,38]. Większość bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* to nieszkodliwe i niewywołujące objawów chorobowych gatunki występujące w wodzie, zamieszkujące przewód pokarmowy człowieka i powierzchnię jego skóry. Znaczna grupa bakterii z tej rodziny to drobnoustroje oportunistyczne, stanowiące zagrożenie dla osób w podeszłym wieku, osłabionych, chorych lub będących w stanie supresji immunologicznej [43]. Przeważająca większość bakterii obecnych w przewodzie pokarmowym jest nieszkodliwa dla człowieka, jednak niektóre gatunki z rodziny *Enterobacteriaceae* uznawane są za organizmy patogenne, odpowiedzialne za zakażenia różnego typu, w tym schorzenia jelitowe [115]. Istnieje grupa patogenów, takich jak przedstawiciele rodzajów *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* czy *Yersinia*, będących głównymi czynnikami zakażeń pokarmowych (ryc. 1) [50,59,67].

Bakteryjne zakażenia pokarmowe wywoływane przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae* są bezpośrednią przyczyną biegunek, czerwonki bakteryjnej, duru brzusznego i innych dolegliwości jelitowych, które są jednym z poważniejszych problemów współczesnego społeczeństwa. Zmagają się z nimi przede wszystkim ludzie zamieszkujący kraje, gdzie zarówno standard życia, jak i higiena sanitarna znajdują się na niskim poziomie, a dostęp do czystej wody pitnej jest ograniczony. Wszystkie te czynniki przyspieszają rozprzestrzenianie się zaru-



Ryc. 1. Patogenność szczepów należących do rodziny *Enterobacteriaceae*



Ryc. 2. Diagram ilustrujący przyczyny śmierci dzieci poniżej 5 roku życia [118]

jelitowych [33]. Zakażenia te są szczególnie groźne u dzieci z niedojrzałym lub uszkodzonym układem odpornościowym, których organizm skłonny jest do szybkich odwoń [68]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) na prawie 4,5 miliarda przypadków – zatrucia pokarmowe są przyczyną śmierci 1,9 miliona osób rocznie i pod względem śmiertelności zajmują trzecie miejsce wśród chorób trapiących ludzkość na całym świecie. Ponadto szacuje się, że do około 99% wszystkich zgonów dochodzi w krajach słabo rozwiniętych [33,118]. Wysoki odsetek zgonów notuje się wśród noworodków i dzieci poniżej piątego roku życia (ryc. 2).

W konsekwencji w krajach rozwijających się, gdzie dzieci są narażone nawet na 12 zakażeń jelitowych rocznie; procent śmiertelności spowodowany zakażeniami przewodu pokarmowego waha się w granicach 15–34% [33]. W ostatnich latach potwierdzono wyniki badań sugerujące, że przebyte we wczesnym dzieciństwie zatrucia pokarmowe mają swoje negatywne konsekwencje w późniejszym okresie życia, co może się objawiać np. osłabioną potencją i reprodukcją [39]. Mimo że epidemie czerwoni czy duru brzuszego występują przeważnie na terenach o słabym stopniu uprzemysłowienia, są one przenoszone także na inne regiony, głównie poprzez geograficzne przemieszczanie się ludności: uchodźców, żeglarzy czy turystów [33]. Z danych statystycznych wynika, że prawie 50% wszystkich podróżujących do krajów Trzeciego Świata zostaje dotkniętych tzw. „biegunką podróżnych” [25]. Jej podstawowa przyczyna to spożycie żywności i wody zakażonych bakteriami (85% przypadków), pasożytami (10%) czy wirusami (5%) [73].

DIAGNOSTYKA ZAKAŻEŃ PAŁECKAMI JELITOWYMI

Poznanie etiologii zakażenia i identyfikacja patogenu, mają fundamentalne znaczenie dla podjęcia właściwego leczenia. Czynniki etiologiczne chorób oraz mechanizmy patogenności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zostały w większości poznane. Należy jednak zauważyć, że bardzo duża liczba przypadków zakażeń notowanych w krajach słabo rozwiniętych, nie pozwala na szybką diagnozę choroby i rozpoczęcie leczenia. Prawidłowa identyfikacja poszczególnych patogenów jest tam możliwa jedynie w laboratoriach badawczych, które nie tylko nie są w stanie działać usługowo na szeroką skalę, lecz nie zawsze mogą sprostać chociażby obsłudze potrzeb miejscowych szpitali [36]. Nowoczesne metody szybkiej diagnostyki zakażeń jelitowych, dające wiarygodne i dokładne wyniki, wymagają najczęściej zarówno dużych nakładów finansowych, jak i czasowych.

Jedną z pierwszych i najczęściej stosowanych metod identyfikacji mikroorganizmów było określanie ich zdolności do przeprowadzania charakterystycznych dla nich reakcji biochemicznych. Testy metaboliczne opierają się na typowaniu bakterii na podstawie obecności swoistych aktywności enzymatycznych, świadczących o obecności danego enzymu w badanych komórkach. Na przykład bakterie będące Gram-ujemnymi pałeczkami, bezwzględnie lub fakultatywnie tlenowymi, fermentujące glukozę oraz wykazujące ujemną reakcję oksydazy, należy – uwzględniając charakterystykę metaboliczną bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* – zakwalifikować do tej grupy pod warunkiem, że rosną na agarze MacConkeya [3]. Możliwość identyfikacji poszczególnych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae* daje hodowla bakterii na podłożu agarowym z dodatkiem żółci i eskuliny. Niektóre szczepy mają zdolność hydrolizy eskuliny do eskuletyny i glukozy. Eskuletyna w obecności jonów Fe^{3+} tworzy zielono-oliwkowe, prawie czarne kompleksy. Na tej podstawie można zidentyfikować takie szczepy, jak np. *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* i *Serratia rubidaea*. Bakterie te wykazują zdolność do hydrolizy eskuliny w 100% w czasie 4 godzin. Jednocześnie metoda ta pozwala na wykluczenie w badanym materiale obecności takich szczepów, jak: *Shigella sonnei*, *Arizona*

hinshawii, *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuartii* czy różnych gatunków *Salmonella*, ze względu na brak zdolności wymienionych szczepów do hydrolizy eskuliny [69]. Hydroliza eskuliny jest tylko jednym z wielu popularnych testów pozwalających na identyfikację pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*. Inne stosowane w bakteriologii testy biochemiczne opierają się na zdolności poszczególnych szczepów do fermentacji glukozy, melibiozy, czy ramnozy, wytwarzaniu indolu, dekarboksylacji niektórych aminokwasów, takich jak np. lizyna, arginina, kwas glutaminowy, czy ureazy powodującej rozkład mocznika itp.

U bakterii należących do rodzaju *Shigella* należy się spodziewać następujących cech metabolicznych: zdolności do fermentacji glukozy, wzrostu na agarze MacConkeya oraz fermentacji laktozy. Jednocześnie rodzaj ten powinien wykazywać ujemny wynik w teście wytwarzania siarkowodoru (wykrywany np. w teście z octanem ołowiu tworzącym w obecności H_2S nierozpuszczalny, czarny siarczek ołowiu). Negatywny odczyn Voges-Proskauera (wytwarzanie acetoiny – acetylometrylokarbinolu, produktu pośredniego w szlaku wytwarzania glikolu butylenowego), brak aktywności ureazy w teście z mocznikiem, brak aktywności deaminazy fenyloalaniny (test PAD) oraz brak ruchliwości w $22^{\circ}C$, to również cechy metaboliczne charakterystyczne dla bakterii rodzaju *Shigella* [3]. Należy jednak zauważyć, że pojawiają się prace wskazujące na istnienie zdolności do ruchu bakterii tego rodzaju [34]. Ze względu na podobieństwo bakterii z rodzajów *Shigella* i *Escherichia* istnieje wiele technik pozwalających na ich różnicowanie. W praktyce rodzaj *Shigella* różnicuje się stwierdzając niezdolność komórek do ruchu i dekarboksylacji lizyny oraz niezdolność wielu szczepów do fermentacji laktozy [21]. Do różnicowania tych dwóch rodzajów pałeczek lub do ich selektywnej hodowli, wykorzystywane są również podłoża selektywne zawierające związki selenu. Podłoża selenowe są bardziej toksyczne dla pałeczek *Escherichia* niż *Salmonella* lub *Shigella* i mogą służyć do wybiórczego namnożenia dwóch ostatnich z wymienionych rodzajów bakterii obecnych w badanej próbce [21].

Wyniki uzyskiwane za pomocą wyżej wymienionych technik pozwalają zawęzić krąg poszukiwań czynnika etiologicznego. Nie dają one jednak pełnej gwarancji, że dany szczep został precyzyjnie zidentyfikowany, gdyż większość szczepów bakterii jest zdolna do przeprowadzania wielu reakcji biochemicznych. Wadą tej metody jest również to, że jest ona bardzo pracochłonna i czasochłonna [95]. Inne opracowane testy diagnostyczne opierają się na immunologicznej detekcji specyficznych markerów, takich jak np. toksyny, czy na oznaczaniu serotypu lipopolisacharydów (LPS), wytwarzanych przez poszczególne szczepy. Identyfikację bakterii z rodzaju *Shigella* umożliwiają również techniki elektroforezy w polu impulsowym (pulsed field gel electrophoresis – PFGE). Po lizie komórek bakteryjnych w buforowanym roztworze zawierającym detergent oraz środki chelatujące (np. SDS, EDTA), prowadzi się trawienie uzyskanego materiału enzymami proteolitycznymi. Kolejnym etapem identyfikacji jest trawienie uwolnionego materiału genetycznego enzymami restrykcyjnymi i elektroforeza uzyskanych fragmentów DNA w polu impulsowym oraz analiza rodzaju i rozkładu uzyskanych fragmentów. Identyfikację bakterii z rodzaju *Shigella*

umożliwia traktowanie materiału proteinazą K, a następnie enzymami restrykcyjnymi *Xba*I lub *Sfi*I; po elektroforzezie otrzymuje się 15–23 fragmentów DNA o wielkości 10–700 par zasad (pz) [149].

Rozprzestrzenianie się zakażeń pokarmowych wywołanych przez poszczególne patogeny w dużej mierze związane jest z wiekiem zakażonych oraz regionem, w jakim schorzenia te występują. Zakażenia pokarmowe powodowane infekcjami wirusowymi są główną przyczyną biegunk w krajach uprzemysłowionych. Z kolei biegunkogenne szczepy *E.coli* (DEC), będące przyczyną zakażeń bakteryjnych, występują zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się [10]. Większość danych epidemiologicznych, pochodzących z krajów rozwijających się i dotyczących biegunk wywołanych patogenami bakteryjnymi jest nieuporządkowana i rozproszona. Dotyczy to w szczególności patogennych szczepów *E. coli*. Do tej pory w krajach słabo rozwiniętych nie był dostępny żaden test diagnostyczny umożliwiający rozróżnienie wszystkich patogenów związanych z biegunkami szczepów *E. coli* (EHEC – enterokrwtoczne; EPEC – enteropatogenne; EAEC – enteroagregacyjne; ETEC – enterotoksyczne; DAEC – dyfuzyjno-adherentne; EIEC – enteroinwazyjne). Jedyną dostępną i stosowaną tam metodą detekcji oraz identyfikacji bakterii jest analiza kału, której wyniki uzyskiwane są najwcześniej po 24 godzinach, a stosowany test nie pozwala na stwierdzenie czy pochodzące z kału bakterie to patogenne pałeczki *E. coli* [36]. W związku z tym, wywołujące biegunki pałeczki *E. coli*, a zwłaszcza te należące do grupy EAEC, mogą nie zostać zidentyfikowane, jako groźne dla zdrowia patogeny, ponieważ nie zostaną wykryte podczas rutynowych analiz laboratoryjnych [88]. Biegunkogenne szczepy *E. coli* (DEC) zostały podzielone na 6 grup ze względu na ich specyficzne czynniki wirulencji. Szczepy ETEC wywołują biegunki wskutek wytwarzania ciepłostabilnych (ST) i ciepłolabilnych (LT) endotoksyn. Szczepy EIEC są blisko spokrewnione ze szczepami *Shigella*, a ich geny wirulencji przenoszone są na plazmidzie pINV. Toksyna Shiga wytwarzana przez enterokrwtoczne szczepy *E. coli* (STEC/EHEC) powoduje zarówno biegunkę niekrwtoczną, jak i krwtoczną zapalenie okrężnicy, które może prowadzić do zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS – haemolytic uremic syndrome). Do czynników wirulencji EHEC należą toksyny Shiga 1 i 2 (Stx1, Stx2) i wyspy patogenności LEE („locus of enterocyte effacement”). Szczepy EPEC przylegają do ścian jelita cienkiego, a wskutek działania czynników wirulencji kodowanych na wyspach patogenności LEE, wywołują zmiany histopatologiczne prowadzące do zniszczenia struktury mikrokosmków i w konsekwencji do zaburzeń transportu elektrolitów. Szczepy mające plazmidy kodujące czynniki adhezencji EPEC (EAF – EPEC adherence factor) zostały nazwane „typowymi” EPEC, podczas gdy szczepy bez EAF nazwano „nietypowymi” EPEC. Drobnoustroje z grupy EAEC są najczęściej diagnozowane u dzieci z ostrą biegunką, u ludzi zakażonych wirusem HIV lub dotkniętych biegunką podróźnych [45]. Biorąc pod uwagę, że sama charakterystyka morfologii bakterii i oznaczenie przeprowadzanych przez nie reakcji biochemicznych, nie są wystarczające do ich identyfikacji, zaczęto drobnoustroje charakteryzować metodami PCR (PCR – polymerase chain reaction). Różnorodne techniki PCR umożliwiające zidentyfikowanie genów kodujących czynniki wirulencji zostały opisane w wielu pracach [49,89,107].

Rodzaj *Shigella*, podobnie jak *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Listeria* i *Vibrio*, to grupa bakterii będących najczęstszą przyczyną chorób zakaźnych przenoszonych przez żywność. Na świecie prowadzonych jest wiele krajowych i międzynarodowych programów monitorowania zakażeń wywołanych przez tę grupę drobnoustrojów. Wykorzystanie metod biologii molekularnej ułatwia ich detekcję. O obecności pałeczek z rodzaju *Shigella* świadczy wykrycie w badanej próbce sekwencji genu *ipaD* (oznaczonego jako SHIG1), a gatunek *Shigella flexneri* o serotypie 2a można dodatkowo zróżnicować poprzez obecność genu *ipaH* (SHIG2) [44]. Obecnie dostępne są komercyjne systemy wykrywania patogennych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wykorzystujące reakcję PCR ilościowego (RT-PCR – real time PCR, qPCR – quantitative PCR). W systemie potrójnego PCR (triplex PCR) możliwa jest detekcja bakterii z rodzaju *Salmonella*, *Shigella* oraz *Campylobacter* [78]. Metody biologii molekularnej nie zawsze jednak prowadzą do pewnej identyfikacji bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Sekwencjonowanie DNA kodującego rybosomalne 16S RNA (16S rDNA) może prowadzić do pomyłek w identyfikacji gatunków *E. coli* oraz *Shigella flexneri*, w których geny te są identyczne [150]. Należy w takich przypadkach przeprowadzić dodatkowe różnicowanie związane ze wzrostem na podłożu selektywnym *Salmonella-Shigella* lub testami metabolicznymi (np. test indolowy, badający zdolność organizmu do hydrolizy tryptofanu do indolu). Do różnicowania wykorzystywany jest również agar cytrynianowy Simmons, w którym kwas cytrynowy stanowiący jedyne źródło węgla, umożliwia wzrost bakterii z rodzaju *Salmonella*, lecz nie *Escherichia* bądź *Shigella* [21].

Niedawno opisana przez Hardegena i wsp. [45] technika Multiplex TaqMan PCR jednocześnie pozwala na detekcję szczepów ETEC, EIEC, EHEC, EPEC i EAEC w badanej próbce, czyli aż pięciu z wszystkich sześciu grup biegunkogennych szczepów *E. coli* DEC. Do identyfikacji EPEC Hardegen i wsp. [45] użyli dwóch sekwencji matrycowych: jedną składającą się z 107 pz sekwencją plazmidu kodującą czynnik adhezencji *E. coli* (EAF) i drugą złożoną z 189 pz sekwencją genu *intiminy* (*eae*). Sekwencją matrycową do wykrycia tą metodą EAEC była sekwencją plazmidu pCVD432 (152 pz). Drugi Multiplex TaqMan PCR posłużył do wykrycia szczepów ETEC i EIEC w badanych próbkach. Matrycą dla ETEC był fragment genu ST (107 pz) oraz sekwencja genu LT (113 pz), a dla EIEC sekwencja plazmidu wirulencji pINV (107 pz), najważniejszego dla inwazyjności tych szczepów. Trzecia analiza PCR umożliwiła detekcję szczepów EHEC dzięki zastosowaniu matrycy 87 pz toksyny Shiga 1 (Stx1) i matrycy 82 pz toksyny Shiga 2 (Stx2). Metoda ta należy do jednej z najbardziej czułych, najdokładniejszych i najszybszych technik identyfikacji mikroorganizmów, lecz nie jest pozbawiona wad [45]. Wiadomo, że przeprowadzenie samej reakcji PCR nie jest czasochłonne i w krótkim czasie mamy dostęp do wyników analizy. Duża czułość tej metody może być także jej wadą. Nawet niewielkie zanieczyszczenie badanej próbki materiałem DNA obcego pochodzenia i jego amplifikacja, może dać niemiernodajne rezultaty. Metoda ta może także dawać fałszywe wyniki w przypadku detekcji DNA bakteryjnego u pacjentów po zastosowaniu wstępnej terapii przeciwbakteryjnej. W takim przypadku nie można określić, czy DNA wykryte w próbce pochodzi od żywego,

czy już martwego patogenu. Należy podkreślić także, że wykrycie DNA drobnoustroju testem PCR bez wystąpienia objawów klinicznych u pacjenta, nie musi oznaczać, że choroba wystąpiła na pewno. Znane są przypadki wykrycia DNA paciorkowców *Streptococcus pneumoniae* w krwi osobników bez jakichkolwiek objawów chorobowych. Ponadto niewątpliwą wadą tej metody jest również koszt wykonania testu, który szacuje się na około 125 dolarów kanadyjskich [74]. Kraje, w których poziom higieny sanitarnej pozostawia wiele do życzenia, borykają się zatem nie tylko z problemami zakażeń jelitowych, lecz także z ograniczonymi możliwościami ich szybkiego diagnozowania, a co za tym idzie – skutecznego leczenia. Dlatego też niezwykle potrzebne jest ogólnodostępne narzędzie o dużej swoistości i czułości, które jednocześnie będzie umożliwiało przeprowadzenie szybkiego testu, potwierdzającego obecność patogennych bakterii.

Obiecującą metodą pozwalającą na szybką identyfikację bakterii jest technika spektrometrii masowej. Najczęściej wykorzystywana jest technika jonizacji próbki poprzez desorpcję laserem z matrycy połączonej z pomiarem czasu przelotu jonów (MALDI-TOF MS – matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry). W technice tej próbka mierzona umieszczana jest wraz z substancją wspomagającą jonizację – matrycą – na płycie podłożowej i suszona. Promień lasera przeprowadza obojętne cząsteczki próbki w naładowane jony, które z kolei ulegają przyspieszeniu w polu elektrycznym. Pomiar czasu ich przelotu pozwala na precyzyjne określenie ich masy cząsteczkowej. W przypadku analizy całych komórek bakteryjnych, analizowany jest cały profil masowy składający się z wszystkich cząsteczek komórki ulegających w danych warunkach jonizacji. Przy analizie szczepu wzorcowego uzyskany profil masowy, po wprowadzeniu do bazy danych, służy jako próba wzorcowa do określenia gatunku bakterii w badanej próbce [130]. Analiza przeprowadzana tą techniką jest szybka i pomijając koszt aparatury jest tania, a liczba gatunków i szczepów w dostępnych bazach danych systematycznie rośnie. Automatyzacja zarówno przygotowania próbek, jak i samej analizy masowej oraz obróbki danych, umożliwia szybkie badanie dużej liczby szczepów. Technika ta ma jednak wiele ograniczeń, do których należy konieczność wcześniejszej klasyfikacji badanego preparatu metodą Grama, ze względu na różnice w protokole przygotowywania próbki oraz ograniczenie identyfikacji do szczepów objętych przez dostępną bazę danych. Poważną trudność stanowi analiza preparatów, które nie są czystymi kulturami pojedynczego szczepu. Problematiczna jest również analiza blisko spokrewnionych szczepów, dla których uzyskane profile masowe będą bardzo zbliżone lub identyczne [20]. Technika MALDI-TOF MS znalazła w biochemii niezwykle szerokie zastosowanie w analizach proteomicznych, sekwencjonowaniu i analizie strukturalnej cząsteczek białkowych. Mimo wymienionych ograniczeń dotyczących analizy profili masowych do celów identyfikacji mikrobiologicznej, technika ta jest intensywnie rozwijana i jej wykorzystanie w przyszłości będzie z pewnością coraz szersze.

OPORNOŚĆ BAKTERII NA ANTYBIOTYKI

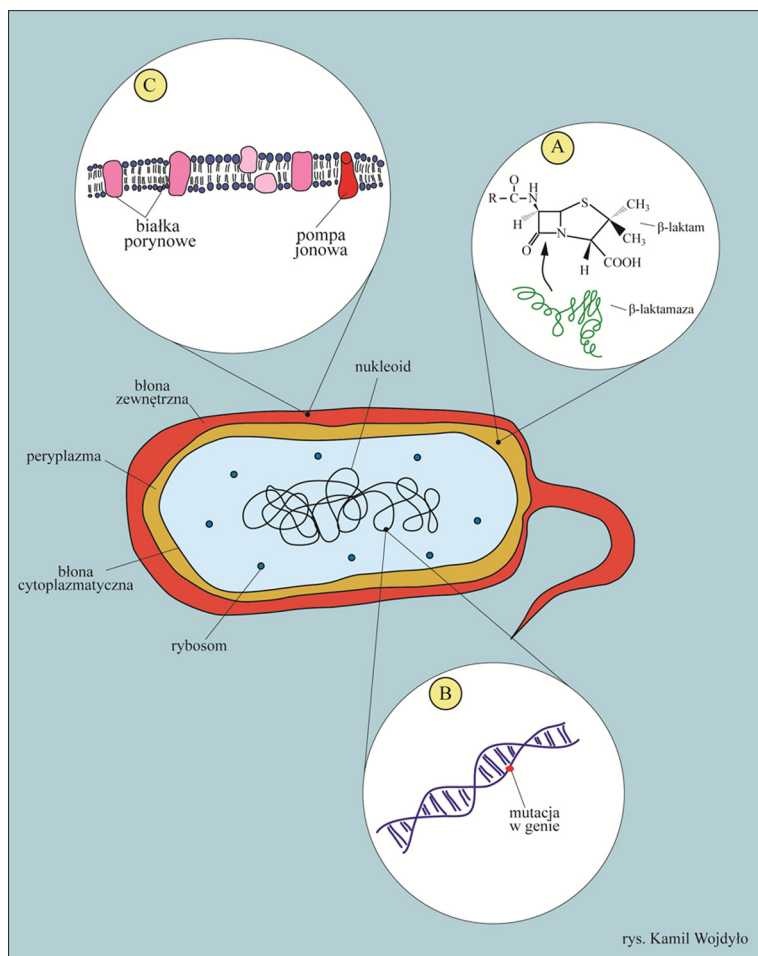
Zastosowanie antybiotyków w terapii zakażeń bakteryjnych umożliwiło leczenie wielu groźnych dla zdrowia infekcji, co przyczynia się do poprawy jakości i wydłużenia

średniego okresu życia ludzkiego, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Jednak niekontrolowane i nieograniczone użycie ich w medycynie, weterynarii, rolnictwie czy w przemyśle spożywczym spowodowało ich powszechną obecność w środowisku. Presja selekcyjna wywierana przez wysokie stężenie antybiotyków w środowisku sprawia, że bakterie wykształcają przeciwko nim swoiste mechanizmy obronne, a to z kolei jest powodem stale rosnącej oporności bakterii na stosowane antybiotykoterapie. Miejscami szczególnie sprzyjającymi rozwojowi szczepów opornych są miejsca wysokiej koncentracji antybiotyków, na przykład ścieki komunalne, zwłaszcza w pobliżu ośrodków szpitalnych. Ścieki przemysłowe uchodzące często do rzek i zbiorników wodnych są bogate w antybiotyki i bakterie odporne na antybiotyki – w szczególności bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [37].

Wśród bakterii Gram-ujemnych należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, są patogeny wywołujące zakażenia układu moczowego (*E. coli*), pokarmowego (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*) i krwionośnego (*Yersinia enterocolitica*), a także powodujące zapalenia płuc (*Klebsiella*, *Enterobacter*). Większość gatunków bakterii należących do rodziny pałeczek jelitowych może być także przyczyną zapalenia otrzewnej czy dróg żółciowych. Wymienione infekcje to często skutek zakażeń szpitalnych lub zaniedbań ze strony systemu ochrony zdrowia. Dlatego też wobec zagrożenia, jakim jest pojawianie się kolejnych szczepów bakterii opornych na antybiotyki, zagadnienia te wymagają od nas nieustannej uwagi [97]. Odkrycia w 1959 roku oporności na antybiotyki przenoszonej przez plazmidy u szczepów *Shigella* wiadomo, że te ruchome elementy genetyczne odgrywają główną rolę w przeniesieniu genów oporności wśród bakterii. Bakteryjna oporność na antybiotyki może zostać nabyta poprzez zmianę (mutację) w sekwencji DNA chromosomalnego lub wskutek przeniesienia elementów genetycznych przez plazmidy, bakteriofagi czy transpozony [136]. Plazmidy są dodatkowymi pozachromosomalnymi elementami, złożonymi z podwójnie skręconej kolistej cząsteczki DNA. Niektóre z nich, nazywane czynnikami R, zawierają geny kodujące mechanizmy oporności na antybiotyki. Plazmidy zdolne są do samoreplikacji, a część z nich dzięki koniugacji zdolna jest także do transfekcji innych bakterii, co z kolei może być przyczyną oporności na większą liczbę antybiotyków. Jedna komórka bakteryjna może jednocześnie przyjąć kilka różnych plazmidów [70]. Bakteriofagi, zawierające cząsteczki DNA oraz białka są wirusami infekującymi bakterie poprzez transdukcję. Mogą one przenosić informację genetyczną kodującą oporność na antybiotyki zawartą zarówno w ich własnych genach, jak i pochodzącą z transpozonów lub wcześniej zainfekowanych chromosomów bakteryjnych [8]. Transpozony są także mobilnymi elementami genetycznymi, a ściślej mówiąc cząsteczkami DNA zdolnymi do samoistnej insercji wewnątrz plazmidów, chromosomów i bakteriofagów. Mogą one zawierać jeden lub kilka genów oporności na antybiotyki [4].

W procesie reprodukcji bakterii można wyznaczyć trzy główne, a zarazem fundamentalne procesy:

- 1) replikacja DNA, w której uczestniczą enzymy, takie jak polimeraza DNA i gyraza DNA;
- 2) transkrypcja (synteza RNA) z udziałem polimerazy RNA;



Ryc. 3. Mechanizmy oporności na antybiotyki; A – bezpośrednia inaktywacja cząsteczki leku, B – modyfikacja miejsca oddziaływania z antybiotykiem, C – redukcja stężenia leku w miejscu jego działania

3) translacja (synteza białek), która przebiega w rybosomach złożonych z dwóch podjednostek 30S i 50S.

Ważnym procesem życiowym bakterii jest również synteza osłon zewnętrznych: ściany oraz zewnętrznej błony komórkowej. Białka mogą w tych procesach pełnić funkcję katalityczną jako enzymy, strukturalną jako składniki błon lub regulatorową będąc represorami. Podczas tych trzech etapów rozwoju bakterii, antybiotyki, wpływając na działanie tych białek, mogą hamować lub uniemożliwiać wzrost i rozwój komórki [119].

Mechanizm oporności bakterii na antybiotyki może polegać na:

- bezpośredniej inaktywacji aktywnej cząsteczki antybiotyku,
- zmianie wrażliwości organizmu na lek poprzez modyfikację miejsca oddziaływania z antybiotykiem lub
- redukcji stężenia leku w miejscu jego działania (ryc. 3) [103].

Jednym z mechanizmów należących do pierwszej z wyżej wymienionych kategorii, jest synteza enzymów zdolnych do degradacji lub modyfikacji cząsteczek leków. Antybiotyki β -laktamowe oddziałują na białka wiążące penicylinę (PBPs – penicillin-binding protein), które są obecne na powierzchni błon cytoplazmatycznych. Białka te katalizują syntezę peptydoglikanu, który wchodzi w skład bakteryjnej ściany

komórkowej. Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe jest synteza białek zwanych β -laktamazami. Enzymy te inaktywują cząsteczkę leku poprzez rozcięcie wiązania amidowego wewnątrz pierścienia β -laktamu [119]. Bakterie Gram-dodatnie, takie jak gatunki z rodzaju *Staphylococcus* wydzielają β -laktamazy na zewnątrz komórki, co uniemożliwia wniknięcie cząsteczki leku do ich wnętrza. W przypadku bakterii Gram-ujemnych enzymy te są ulokowane w przestrzeni peryplazmatycznej. Dlatego też antybiotyk, który pokona barierę błony zewnętrznej, przedostając się przez poriny, jest inaktywowany w tym miejscu, czyli jeszcze przed związaniem się do PBPs. Wśród *Enterobacteriaceae* znane są dwa główne typy β -laktamaz: TEM-1, TEM-2 (popularne szczególnie wśród szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae*) i SHV-1 (najczęściej występujące u *K. pneumoniae*), kodowanych na plazmidach i transpozonach [97,98,119].

Za hydrolizę pierścienia β -laktamu odpowiedzialna jest reszta Ser70, umiejscowiona w miejscu aktywnym β -laktamazy. Zamiana jednego, dwóch lub trzech aminokwasów położonych blisko miejsca aktywnego enzymu, może spowodować zmiany w hydrolizie substratu. Jest to szczególnie rodzaj β -laktamaz o szerokim zakresie działania [55]. Pojawienie się oraz rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* jest groźnym, wymagającym szczególnej uwagi zjawiskiem. W przypadku oporności na cefalosporyny jednym z rozwiązań problemu była synteza cefalosporyn

o szerokim zakresie (extended-spectrum cephalosporins), niewrażliwych na hydrolizę przez β -laktamazy TEM-1 i SHV-1. Niestety, w latach osiemdziesiątych XX w. okazało się, że wystąpienie nowej mutacji punktowej spowodowało, że enzymy TEM-1 i SHV-1 nazwane β -laktamazami o szerokim zakresie (extended-spectrum β -lactamases – ESBLs), nabyły zdolność do hydrolizy oksymino- β -cefalosporyn (takich jak np. cefotaxime, cefpodoksym, ceftazimide) i aztreonamu, zwanych ogólnie cefalosporynami trzeciej generacji. Syntetyzowane przez bakterie β -laktamazy o szerokim zakresie, jest jednym z najpoważniejszych problemów, związanych z rosnącą opornością bakterii na antybiotyki [56,97,141]. Z raportu Międzynarodowego Nadzoru Zakażeń Szpitalnych (NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance) z 2003 roku wynika, że w Stanach Zjednoczonych aż 20,6% szczepów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych od chorych z oddziałów intensywnej terapii (ICUs – intensive care units), było opornych na cefalosporyny trzeciej generacji [97]. Oporność ta została także stwierdzona wśród szczepów *Enterobacter* (31,1%) oraz *E. coli* (5,8%) [99].

Innymi, odkrytymi nieco później β -laktamazami, były ESBLs typu CTX-M, które warunkowały oporność na cefotaxime, ceftriaxone i aztreonam [71]. Syntezę tych enzymów wykryto u szczepów *E. coli*, *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* [141].

Poważnym problemem są także odporne na cefalosporyny trzeciej generacji pałeczki jelitowe z rodzaju *Salmonella*, które wytwarzają β -laktamazy AmpC (AmpC β -lactamases) [23]. Oporność ta jest w szczególności związana z plazmidem CMY-2 i powoduje, że szczepy *Salmonella* są niewrażliwe na działanie leków, takich jak np. ceftriaxone. Cecha ta nie jest jeszcze szeroko rozpowszechniona wśród szczepów inwazyjnych w Stanach Zjednoczonych, jednakże jej nabycie przez szczepy wrażliwe jest kwestią czasu i wymaga więc stałej obserwacji [97].

Wśród szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae* wytwarzających ESBLs i wywołujących zakażenia przewodu pokarmowego, są niewrażliwe na działanie antybiotyków pałeczki: *Salmonella*, *Shigella* oraz wytwarzające toksynę Shiga szczepy *E. coli* [52,58,65,87,101]. Antybiotyki aminoglikozydowe, oddziaływając na mniejszą podjednostkę rybosomu (30S), utrudniają odczyt cząsteczki RNA podczas translacji, powodując wskutek tego skrócenie syntezy białka. Jednym z najbardziej powszechnych mechanizmów inaktywacji tych leków, jest chemiczna modyfikacja aminoglikozydu przez N-acetylację, O-nukleotydylację i O-fosforylację [42]. *Enterobacteriaceae* należą do organizmów wykorzystujących ten właśnie mechanizm [119].

Acetylotransferaza chloramfenikolu jest enzymem indukującym acetylację dwóch grup hydroksylowych w cząsteczce chloramfenikolu. Po takiej modyfikacji antybiotyk ten staje się niezdolny do wiązania podjednostki 50S rybosomu, a tym samym nie pozwala na zablokowanie syntezy białek bakteryjnych. Enzym ten występuje zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, włączając w to m.in. *Enterobacteriaceae* [119]. Wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* oporność na chloramfenikol charakteryzuje wiele szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* [7].

Białka wiążące penicylinę (PBPs) odgrywają bardzo ważną rolę w biosyntezie ściany komórkowej bakterii. Podczas

syntezy peptydoglikanu uczestniczą one w reakcjach transpeptydacji i transglikozylacji. Nadmierne wytwarzanie PBPs oraz mutacje w obrębie tych białek, powodujące zmniejszenie ich powinowactwa do β -laktamaz, należą do drugiej grupy wcześniej wymienianych mechanizmów oporności [142].

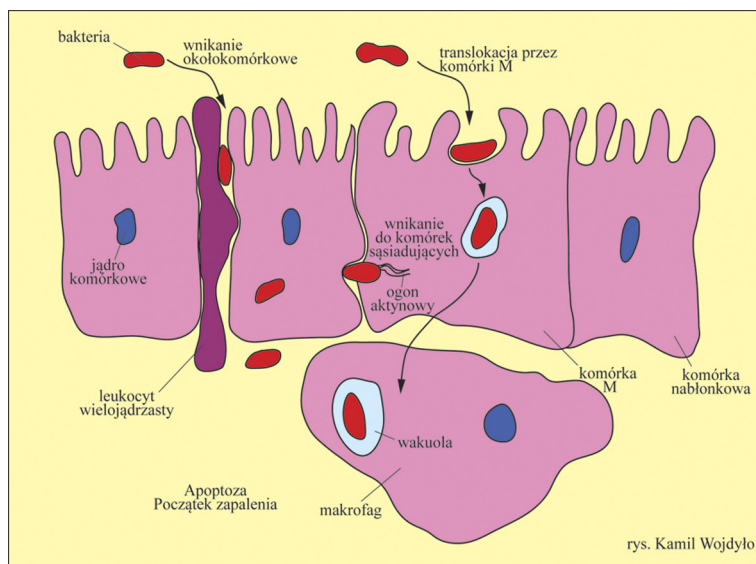
Innym przykładem modyfikacji genetycznej, powodującej zmianę powinowactwa enzymu do antybiotyku, jest zmiana w sekwencji gyrazy DNA. Enzym ten odpowiada za wprowadzanie superskrętów w DNA podczas replikacji i transkrypcji. Chinolony to antybiotyki, które działają bakteriobójczo przez zahamowanie syntezy DNA patogenu wskutek inhibicji gyrazy. Wystąpienie u bakterii mutacji w obrębie genów gyrazy powoduje utratę powinowactwa enzymu do chinolonów i działanie tych antybiotyków staje się nieefektywne [119]. Stwierdzono, że wśród pałeczek *Enterobacteriaceae* przyczyną oporności na chinolony jest mutacja w obrębie genu gyrazy *gyrA* na kodonie 83, występująca zwłaszcza u szczepów *E. coli*, *Citrobacter freundii* i różnych gatunków *Shigella* [113].

Ostatni z wymienianych wcześniej mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki, polega na zmianie przepuszczalności błony bakteryjnej, a co za tym idzie utrudnieniu przepływu przez nią antybiotyków. Wymiana makrocząsteczek między komórką a otaczającym ją środowiskiem jest możliwa dzięki białkom obecnym w błonie zewnętrznej (Omps – outer membrane proteins). Białka te zwane porynami są obecne w błonie zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Poryny, takie jak OmpF, mające kanały o większej średnicy, mogą być zastępowane przez mniejsze poryny, takie jak OmpC. Taka zamiana zapobiega przedostawaniu się do wnętrza komórki większych cząsteczek, takich jak np. ujemnie naładowana i wysoce hydrofobowa karbenicylina [90]. Duże znaczenie dla stężenia leków w komórce bakteryjnej mają pompy jonowe obecne na powierzchni komórek bakteryjnych, które dzięki zdolności wykorzystania energii mogą zredukować koncentrację antybiotyków w komórce do poziomu dla niej nietoksycznego. *E. coli* jest jednym z gatunków wykorzystujących swoistość transportera kasyety wiążącej ATP (ABC – ATP-binding cassette) do usuwania szkodliwych cząsteczek na zewnątrz komórki [60].

Rozprzestrzenianie się mechanizmów oporności wśród patogennych bakterii, a także pojawienie się szczepów wykazujących oporność wielolekową, jest ważnym problemem terapeutycznym. Wyjściem z tej sytuacji wydaje się nie tylko zachowanie odpowiedniej higieny sanitarnej oraz skierowanie uwagi na badania dotyczące nowych leków i skutecznych szczepionek, ale także opracowanie dodatkowych markerów umożliwiających szybką diagnostykę zakażeń.

SHIGELOZA, JAKO JEDNA Z ISTOTNIEJSZYCH CHOROBY WYWOŁANYCH PRZEZ *ENTEROBACTERIACEAE*

Liczba zachorowań na shigelozę – czerwonkę bakteryjną – w krajach rozwijających się sięga 167 milionów przypadków rocznie, z czego około milion przypadków kończy się śmiercią [104]. Do najbardziej charakterystycznych objawów shigelozy należą wodniste lub krwawe biegunki, często zawierające śluz, gorączka i bóle brzucha. Do wywołania choroby wystarczy niewielka liczba komórek

Ryc. 4. Schemat wnikania pałeczek *Shigella* do komórek gospodarza

bakteryjnych (10–100), które nie giną w kwaśnej treści żołądka. Zakażenia takie występują często u ludzi starszych i małych dzieci. W tych grupach wiekowych ze względu na skutki, jakie wywołują one w organizmie chorego, mogą one stanowić zagrożenie życia.

Pałeczki *Shigella* to Gram-ujemne, nieruchome i niefermentujące laktozę drobnoustroje należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Gatunek *S. flexneri* obejmuje 16 serotypów, *S. dysenteriae* – 13 serotypów, *S. boydii* – 18 serotypów a *S. sonnei* – 1 serotyp. *S. dysenteriae* typ 1 wytwarza jedną z najsilniejszych znanych toksyn, jaką jest toksyna Shiga. Pałeczki *S. sonnei* i *S. boydii* powodują zatrucia o łagodniejszym przebiegu niż szczepy *S. flexneri* i *S. dysenteriae*. Oporność na antybiotyki wśród rodzaju *Shigella* jest bardzo częsta i wykazuje tendencję wzrostową. Do antybiotyków nieskutecznych w walce z shigelozą, możemy zaliczyć obecnie m.in. ampicylinę czy trimetoprim-sulfametoksazol. Prowadzone są badania nad skuteczną szczepionką przeciwko shigelozie, która chroniłaby przed zakażeniami spowodowanymi przez wszystkie serotypy z gatunku *Shigella*. Szczegółowa wiedza dotycząca epidemiologii shigelozy, to zagadnienie podstawowe dla wyboru potencjalnych kandydatów do skutecznej szczepionki, pozwalającej na zapanowanie nad tą chorobą [104,135].

Niewiele wiadomo na temat struktur odpowiedzialnych za adhezję oraz mechanizmów oddziaływania bakterii *Shigella* z komórkami gospodarza w trakcie zakażenia. W odróżnieniu od innych enteropatogenów, które przeważnie kolonizują ściany jelita cienkiego, *Shigella* preferencyjnie zasiedla inne odcinki przewodu pokarmowego, wybierając nabłonek wyścielający okrężnicę i odbytnicę. To, że wiązanie się bakterii do nabłonka nie jest hamowane przez monosacharydy wskazuje, że występujący u *Shigella* receptor adhezyjny jest sacharydem o złożonej strukturze [108].

Białka odpowiedzialne za adhezję pałeczek *Shigella*, są jednocześnie białkami zapoczątkowującymi proces inwazji tych bakterii. Po udanej adhezji bakterie *Shigella* inicjują aktywację systemu sekrecji typu III (T3SS – type III secretion systems) oraz wydzielanie białek efektorowych

do komórek gospodarza. Systemy sekrecji typu III są głównymi determinantami wirulencji bakterii Gram-ujemnych, pełniącymi rolę mediatorów w transporcie czynników wirulencji z cytoplazmy bakterii do komórek gospodarza. System T3SS występujący u *Shigella* składa się z około 20 różnych białek, włączając w to integralne białka błonowe, chaperony i inne białka towarzyszące. Białka te zostały podzielone na dwie główne grupy: bakteryjne białka zakotwiczone w błonie i zewnątrzkomórkowe wypustkopodobne filamenty (zwane często kanałem translokującym), umożliwiające wstrzykiwanie białek efektorowych [82]. Transport białek efektorowych przez kanały translokujące do przestrzeni peryplazmatycznej gospodarza jest napędzany przez energię uzyskiwaną z ATP. Geny odpowiedzialne za translokację u *Shigella* oraz kodujące białka efektorowe, włączając w to 4 bakteryjne chaperony, są umiejscowione na wyspach patogenności (31 kbp) wewnątrz dużego plazmidu wirulencji (213 kbp) [48].

Po udanej adhezji pałeczki *Shigella* zapoczątkowują proces wnikania do wnętrza komórki gospodarza (ryc. 4). Białko IpaB wiąże się do receptora kwasu hialuronowego (CD44), podczas gdy kompleks IpaB/IpaC oddziałuje z receptorem fibronektynowym integryny ($\alpha 5\beta 1$). Następnie IpaB/IpaC tworzy struktury przypominające pory, występujące wewnątrz błony komórkowej gospodarza. Pory te umożliwiają włączenie systemu T3SS do cytoplazmy komórki eukariotycznej oraz dostarczanie innych białek efektorowych. Najprawdopodobniej w tworzeniu się por w błonie gospodarza uczestniczą cząsteczki cholesterolu obecne na tratwach lipidowych, do których wiąże się białko IpaB [47]. Podczas wnikania do komórek gospodarza komórki *Shigella* mają zdolność do przekształcania i przemieszczania fragmentów błony. W miejsca te kierowane są także białka sygnałowe, stanowiące przyszły cel dla bakterii. Białko efektorowe IpaD, znajdujące się na powierzchni T3SS jest zaangażowane w rozpoznanie i kontakt z błoną gospodarza, a także odpowiada za uwalnianie innych białek efektorowych [26].

Po utworzeniu porów w błonie komórki M lub komórki nabłonka, kompleks IpaB/IpaC inicjuje proces polimeryzacji

aktywny. C-końcowa domena IpaC aktywuje białko Cdc42, które z kolei włącza aktywność białka Rac1, czego skutkiem jest indukcja formowania przedłużeń filopodii i lamellipodii [126]. Bakterie *Shigella* aktywują kinazę tyrozynową Src (pp60c), biorącą udział w fosforylacji białek odpowiedzialnych za polimeryzację aktywny, takich jak kortaktyna. Dokładny mechanizm tej aktywacji nie jest dołąd poznany [22].

Receptor kwasu hialuronowego, aktywowany przez białko IpaB przyciąga ezrynę do miejsca wejścia, co wydaje się zjawiskiem zależnym od białka Rho, którego aktywacja jest wspomagana przez kompleks IpaB-CD44. Ezryna łączy się z F-aktyną i pełni w strukturach filopodii funkcję łącznika pomiędzy błoną a cytoszkieletem [121]. VirA jest białkiem kodowanym przez plazmid wirulencji i wydzielanym w sposób niezależny od Ipa. Oddziałuje ono i destabilizuje heterodimery a/b-tubuliny, stymulując przy tym prawdopodobnie aktywność Rac-1, co wspomaga formowanie struktur lamellipodialnych wokół miejsc wnikania bakterii [152]. Dwoma innymi białkami, wydzielanymi przez T3SS są białka IpgD i IpaA. IpgD jest fosfatazą, wykazującą homologię do białek SopB/SigD występujących u *Salmonella*. Białko to katalizuje defosforylację 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu – PtdIns(4,5)P₂ – do monofosforanu – PtdIns(5)P – w miejscu wejścia, a to z kolei pobudza aktywację szlaku kinaza PI-3/Akt i wspomaga przetrwanie komórki bakteryjnej [100]. IpaA tworzy kompleks z jednym z białek ogniskowych – winkuliną i aktywuje pokrywanie winkuliną szybko rosnący koniec F-aktywny, powodując jej depolimeryzację [105]. Pałeczki *Shigella* po wnikięciu przez komórki M do komórek nabłonka pęcherzykowego (FAE – follicular-associated epithelium), niszczą błonę wakuol w procesie zależnym od inwazyjnych białek IpaB i IpaC oraz przedostają się do cytoplazmy komórek gospodarza, gdzie się namnażają. W cytoplazmie komórek eukariotycznych patogeny te akumulują spolimeryzowaną aktywną, którą następnie wykorzystują jako „ogon”, umożliwiając im poruszanie się w cytoplazmie i wnikanie do komórek sąsiadujących. Polimeryzacja aktywny uzależniona jest od aktywności białka błony zewnętrznej IcsA (IcsA – intracellular spread A), nazywanego także VirG, które ma rozkład polarny na powierzchni komórki bakteryjnej. IcsA wykorzystuje białka komórek cytoszkieletu gospodarza, oddziałując na białko N-WASP oraz zwiększając jego powinowactwo do Arp2/3. Tworzy ono kompleks IcsA/N-WASP/Arp2/3, który indukuje powstawanie aktywny. IcsA angażuje także winkulinę, która mimo że nie jest niezbędna patogenowi do ruchu, może się przyczyniać do polimeryzacji aktywny. Ponadto czynniki depolimeryzacji aktywny, takie jak (ADF)/kofilina, pokrywając białka i wykazując właściwości profilujące, są zaangażowane w stabilizację „ogona”. Poruszanie się pałeczek *Shigella* w komórce gospodarza jest także uzależnione od białka VirA, odpowiedzialnego za rozkład tubuliny. Dzięki niemu komórka bakteryjna może się przemieszczać przez sieć mikrotubuli [152]. Kiedy bakteria dociera do wewnętrznej, bazolateralnej powierzchni błony komórki gospodarza, formowana jest palcopodobna wypustka, przebijająca się do sąsiadujących komórek nabłonkowych. Komórki *Shigella*, które raz uległy endocytozie, uwalniane są następnie z wakuol, namnażają się w cytoplazmie gospodarza oraz przedostają się do kolejnych komórek, przyczyniając się do rozprzestrzenienia zakażenia. Proces ten powoduje rozluźnienie

spójności sąsiadujących komórek poprzez zmianę ekspresji białek odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe. Zniszczenie integralności błony śluzowej prowadzi do masowej inwazji komórek bakteryjnych [41].

Wskutek inwazji bakterii komórki nabłonkowe zaczynają wytwarzać cytokiny prozapalne, takie jak IL-8, które wspólnie z zakażającymi bakteriami silnie przyciągają leukocyty wielojądrowe (PMN – polymorphonuclear leukocyte) z warstwy nabłonkowej do światła jelita. Przenikanie PMN może zaostrzać inwazję bakteryjną w początkowym stadium zakażenia. W późniejszym etapie hamuje ono infekcję do czasu, kiedy PMN są w stanie powstrzymać patogenne bakterie przed przedostaniem się przez nabłonek pęcherzykowy (FAE – follicle – associated epithelium) do krwiobiegu. Niekorzystną konsekwencją wydzielania PMN jest ostre zapalenie oraz zniszczenie nabłonka okrężnicy, prowadzące do powstania owrzodzeń i ropni śluzówki [120].

Po przejściu pałeczek *Shigella* przez komórki M, bakterie znajdują się w komórkach FAE, czyli w regionie niezwykle bogatym w makrofagi i komórki dendrytyczne. W dalszym etapie dochodzi do pyroptozy makrofagów, która jest konsekwencją przemieszczenia się białka IpaB, aktywującego kaspazę 1. Enzym ten rozcina IL-1b i IL-18 oraz umożliwia przekształcenie prekursorów w dojrzale i aktywne cytokiny [40]. W aktywację kaspazy 1 przez IpaB wydaje się być zaangażowane białko IpaF, odpowiadające za rozpoznanie komórki bakteryjnej. Białko to należy do receptorów NOD-podobnych (NLRs – NOD like receptors), zlokalizowanych w błonach plazmatycznych i endosomalnych [123]. Uwalnianie IL-1b powoduje przerwanie bariery, jaką stanowi nabłonek i wspomaga tym samym rozprzestrzenianie się bakterii, a w konsekwencji prowadzi do indukcji zakażenia i zniszczenia tkanek w okrężnicy. Jednoczesne uwalnianie IL-18 i IFN-γ poprzez aktywację komórek układu odpornościowego wspomaga walkę z patogenami [137]. Pałeczki *Shigella* poprzez system T3SS wydzielają także białka efektorowe, które są zaangażowane w regulację stanu zapalnego i mogą ułatwiać wczesne etapy zakażenia. Jak wiadomo, akumulowane w jądrze białko IpaH wiąże się do czynnika splicing U2AF ssaków, stymulując ekspresję cytokin prozapalnych [110].

ODPOWIEDŹ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO NA ZAKAŻENIE PAŁECZKAMI SHIGELLA

Ostry stan zapalny spowodowany czerwonką bakteryjną może się utrzymywać w jelicie nawet ponad miesiąc. Przez ten czas komórki układu odpornościowego wytwarzają ogromne ilości cytokin, takich jak: IL-1, TNF-α, IL-6, IFN-γ, TNF-β, IL-4, IL-10, TGF-β i IL-8 [106]. Kliniczne objawy shigelozy mogą być bezpośrednim skutkiem wydzielania cytokin. Jednocześnie cząsteczki te uczestniczą w regulacji i kontroli zapalenia na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

Obecne w tkance makrofagi i naciekające monocyty są zdolne do efektywnego zabijania komórek *Shigella flexneri* w swoich fagosomach i apoptozy [46,154]. Uwalnianie IL-18 podczas apoptozy makrofagów może aktywować komórki NK i limfocyty T, indukując tym samym wytwarzanie IFN-γ [6]. Doświadczenia przeprowadzone na myszach

z nieczynnym genem odpowiedzialnym za syntezę IFN- γ wykazują, że są one pięć razy bardziej podatne na infekcje pałeczkami *Shigella* niż te zwierzęta, których makrofagi i komórki fibroblastów wytwarzają go w naturalny sposób. IFN- γ sprzyja oczyszczaniu zakażonych komórek, a także hamuje dalszy rozwój patogenów w organizmie gospodarza [137]. Jednym z najważniejszych skutków odpowiedzi immunologicznej gospodarza, związanym z wydzielaniem cytokin, jest migracja komórek PMN. Czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B jest aktywowany przez zakażone pałeczkami *Shigella* komórki nabłonkowe. Mechanizm tej aktywacji zależy od lipopolisacharydu bakterii i prowadzi do sekrecji IL-8 przez zakażone komórki [61]. IL-8 jest potencjalnym chemoatraktantem komórek PMN, a także czynnikiem powodującym wydzielanie IL-1 podczas apoptozy makrofagów. Bakterie *Shigella* są degradowane wewnątrz fagosomu [80]. Badania wykazały także, że ludzka elastaza neutrofilów, jedno z głównych białek występujących w granulocytach obojętnochłonnych, jest zdolna do degradacji wirulentnych białek pałeczek *Shigella* już po 10 min od zakażenia neutrofilów [140]. Komórki PMN, ograniczając zarówno wnikanie patogenów do wnętrza komórki gospodarza, jak i ich rozprzestrzenianie się w całym organizmie, odgrywają niewątpliwie główną rolę w kontrolowaniu zakażenia pałeczkami *Shigella* [116].

Inny mechanizm skierowany przeciwko drobnoustrojom z rodzaju *Shigella* jest związany z jedną z glikoprotein – laktoferyną. Jest ona obecna w wydzielinie śluzowej, mleku matki i komórkach fagocytarnych. Białko to, dzięki ekspozycji kompleksu IpaB/IpaC na działanie degradujących go proteaz, może osłabiać zdolność bakterii *S. flexneri* do wnikania do komórek HeLa. Proces ten prowadzi do zniszczenia powierzchni komórki bakteryjnej [35]. Znacznie mniej wiadomo na temat odpowiedzi komórkowej gospodarza na zakażenia wywołwane przez bakterie z rodzaju *Shigella*. Islam i Christensson wykazali znaczny wzrost liczby aktywnych limfocytów T CD8⁺ w krwi obwodowej i w biopsjach tkanki z końcowego odcinka przewodu pokarmowego pacjentów cierpiących na shigelozę [53]. Z wcześniejszych badań wynika, że limfocyty T pochodzące od pacjentów z czerwonką bakteryjną proliferowały w odpowiedzi na antygeny *S. flexneri* [153]. Cytokiny indukowane przez antygeny *Shigella* wskazują na odpowiedź limfocytów Th1 i Th2 [63,132]. Natomiast badania Waya i wsp. [139], prowadzone na myszach z uszkodzonym genem odpowiedzialnym za wytwarzanie limfocytów T wykazały, że u zwierząt, którym podano najpierw atenuowany szczep *Shigella flexneri*, a następnie ten sam szczep dziki, nie rozwijało się zakażenie. Autorzy ci uważają, że nawet jeśli występuje odpowiedź limfocytów T na antygeny bakterii, to nie odgrywa ona ważnej roli w ochronie przed zakażeniem [139].

Dotychczasowe badania dostarczają coraz więcej danych na to, że główną rolę w odpowiedzi na zakażenie pałeczkami czerwonki odgrywa odpowiedź humoralna, włączając w to odpowiedź układową i śluzówkową, skierowaną przeciwko LPS i białkom kodowanym na plazmidach wirulencji. Lipopolisacharyd jest przypuszczalnie jednym z głównych antygenów indukujących odpowiedź immunologiczną komórek gospodarza. Przebyta infekcja lub szczepienie wywołuje swoistą dla danego serotypu bakterii *Shigella* odpowiedź immunologiczną na zakażenie, głównie w układzie homologicznym, lecz niestety nie gwarantuje ochrony w układzie

heterologicznym [24,31,84]. Należy jednak podkreślić, że przeciwciała skierowane przeciwko wspólnym epitonom antygenów O, obecne w surowicach ludzi (ochotnicy) i immunizowanych zwierząt (małpy), wykazują pewien stopień reaktywności krzyżowej [131]. W odpowiedzi humoralnej na swoiste serotypowo antygeny *S. flexneri* są wytwarzane przeciwciała klasy IgG, IgM oraz wydzielnicze IgA (sIgA – secretory IgA). sIgA składają się z dwóch jednostek IgA i dwóch polipeptydów, łańcucha J i składnika wydzielniczego (SC – secretory component). Wydzielnicze IgA ulegają transcytozie do światła jelita, gdzie składnik wydzielniczy wiąże się do warstwy śluzówkowej nabłonka, tworząc warstwę pokrywającą komórki nabłonkowe [102]. sIgA mogą także pokrywać błonę zewnętrzną komórek bakteryjnych blokując wnikanie bakterii przez zapobieganie adhezji bakterii do powierzchni śluzówki, obniżanie ich cytotoksyczności, a także dzięki ich rozkładowi przez czynniki wzrostu [51]. Przeciwciała sIgA anty-LPS obecne w mleku matek dotkniętych uprzednio shigelozą, prawdopodobnie są bardzo ważne w redukcji objawów chorobowych u noworodków zakażonych pałeczkami *Shigella* [11].

Chociaż shigelozę to schorzenie związane głównie z zakażeniem błon śluzowych, to w surowicy ludzi dotkniętych tą chorobą obecne są przeciwciała klasy IgG i IgM skierowane przeciwko antygenom bakterii kodowanym przez geny obecne na plazmidach wirulencji, jak i przeciw LPS [13,54,94]. W badaniach Waya i wsp. [138], przeprowadzonych na myszach z uszkodzonym genem odpowiedzialnym za wytwarzanie IgA wykazano, że po immunizacji zwierząt preparatem LPS są wytwarzane przeciwciała klasy IgG i IgM, które w układzie homologicznym zapobiegają rozwojowi zakażenia pałeczkami *Shigella*, gwarantując zwierzętom pełną ochronę [138].

KIERUNKI ROZWOJU BADAŃ NAD SZCZEPIONKAMI PRZECIWKO PAŁECZKOM JELITOWYM

Najważniejszym zadaniem układu odpornościowego jest obrona przed zagrożeniami jakimi są wirusy, bakterie, pasożyty czy substancje toksyczne. Jeżeli w organizmie człowieka pojawiają się obce antygeny dochodzi do wzbudzenia reakcji immunologicznej. Jest to możliwe dzięki prawidłowo działającemu układowi odpornościowemu, który rozpoznaje obce komórki czy substancje, celem ich zniszczenia i co więcej ich zapamiętania. Odpowiedź na obce antygeny musi być swoista, ograniczona w czasie i przestrzeni, odpowiednio kontrolowana i regulowana. W zdecydowanej większości przypadków układ odpornościowy człowieka skutecznie eliminuje zagrożenie. Niemniej jednak zdarza się, że organizm nie jest w stanie skutecznie przeciwstawić się drobnoustrojom. Jednym ze sposobów wzbudzenia ochrony przed rozwojem zakażenia jest stosowanie systemu szczepień. Szczepionka to zwykle preparat pochodzenia biologicznego, który zawiera żywe lub zabite drobnoustroje chorobotwórcze lub fragmenty ich struktury, czy metabolity. Antygeny te muszą być zdolne do indukcji procesów immunologicznych i powstania trwałej swoistej odporności bez wywoływania działań toksycznych. Szczepionka może być stosowana w celach profilaktycznych bądź leczniczych.

Za ojca wakcynologii, nauki zajmującej się badaniami nad szczepionkami i ich wpływem na odporność, uważa się

Ludwika Pasteura, który przygotował pierwszą szczepionkę dla ludzi w postaci atenuowanych mikroorganizmów. Stwierdził także, że poddanie bakterii działaniu różnych czynników fizycznych, takich jak np. temperatura, zawartość tlenu czy różne składniki dodawane do podłoża, prowadziło do zmniejszenia stopnia ich zjadliwości. Pasteur w wyniku zastosowania doświadczalnych warunków hodowli, uzyskał niezjadliwe szczepy węglik i cholery ptasiej [72]. Od czasów Pasteura obserwuje się stały wzrost zainteresowania szczepionkami, a nowe odkrycia w dziedzinie immunologii, mikrobiologii molekularnej, biotechnologii dają szansę na tworzenie nowoczesnych, bezpiecznych i skutecznych szczepionek [5].

Zanim nastąpił rozwój metod biologii molekularnej, do tworzenia szczepionek przeciw zakażeniom bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* używano między innymi szczepów atenuowanych lub antygenów zdolnych do stymulacji układu odpornościowego. Celem zapobiegania biegunkom wywołanym przez szczepy ETEC, u ochotników zastosowano doustną szczepionkę, której składnikiem były oczyszczone białka fimbrialne CFA/I i CFA/II (swoiste antygeny rzęskowe, biorące udział w kolonizacji jelit) [27]. Cryz i wsp. [15] opracowali szczepionkę, w skład której wchodziło sześć różnorodnych serotypów polisacharydów otoczkowych (K2, K3, K10, K21, K30, K55). Preparat ten był nietoksyczny i obserwowano znaczny wzrost poziomu przeciwciał klasy IgG w surowicy [15].

W badaniach modelowych na zwierzętach wykazano, że immunizacja myszy preparatem LPS z *Klebsiella* O3 ma silne działanie adiuwantowe na wytwarzanie przeciwciał IgM i IgG [151]. Natomiast podanie myszom monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciw antygenom O szczepu *Klebsiella pneumoniae* O1: K2 chroniło zwierzęta przed śmiertelną dawką otoczkowego szczepu *Klebsiella pneumoniae* tego samego serotypu [81]. W przypadku zakażeń szczepami z rodzaju *Salmonella* stwierdzono, że skuteczniejszą ochronę zapewniało podanie żywych atenuowanych niż inaktywowanych bakterii [64,76]. Jest to prawdopodobnie spowodowane lepszą aktywacją komórek nabłonka wyścielającego przewód pokarmowy do wytwarzania IgA.

Celem opracowania skutecznych szczepionek przeciwko *Enterobacteriaceae* prowadzone są badania nad różnorodnymi antygenami, których użycie zapewni uzyskanie odporności zabezpieczającej przed zachorowaniem. Są to badania wielokierunkowe, znajdujące się aktualnie na różnych stopniach zaawansowania [32,122,147]. Podobieństwo tej grupy bakterii pod względem antygenowym daje realne szanse na opracowanie skutecznej, wieloważnej szczepionki chroniącej przed zakażeniami wieloma gatunkami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae* [77].

POTENCJALNE ANTYGENY DO TWORZENIA SZCZEPIONEK PRZECIWKO SHIGELOZIE

Mechanizm odpowiedzi immunologicznej przeciwko pałeczkom *Shigella* nie został do końca wyjaśniony. Istnieją jednak dane, że zarówno naturalne, jak i wywołane eksperymentalnie zakażenia pałeczkami jelitowymi z rodzaju *Shigella*, indukują typową, swoistą odpowiedź immunologiczną o określonej trwałości. Jednym z potencjalnych

antygenów do szczepionki przeciw shigelozie, wywołującym taką odpowiedź immunologiczną jak naturalna infekcja, jest polisacharyd O-swoisty. Wstępne badania wykazały, że po naturalnej infekcji szczepami *Shigella* obecne są w surowicy przeciwciała klasy IgG, IgA i IgM skierowane przeciwko tym polisacharydom [29,109,124].

Białka błony zewnętrznej ściany komórkowej pałeczek jelitowych (outer membrane proteins – OMPs) mogą być odpowiednim antygenem lub nośnikiem do opracowywanej szczepionki przeciwko shigelozie. Jak wynika z wcześniejszych rezultatów Witkowskiej i wsp. [144,145,148], immunizacja zwierząt białkami wyizolowanymi z błony zewnętrznej (OMPs) ściany komórkowej *Shigella*, powoduje wzbudzenie zarówno komórkowej, jak i humoralnej odpowiedzi immunologicznej [146].

Jak dotąd nie pojawiła się jeszcze na rynku dostępna, licencjonowana szczepionka przeciwko shigelozie, chociaż w wielu laboratoriach prowadzone są badania w tym kierunku i rozważane są różne koncepcje jej konstruowania. Pod uwagę brane są także możliwości przygotowania szczepionki hybrydowej *Shigella* – *E. coli* (lub *S. typhi*) [62], szczepionki z atenuowanym szczepem *Shigella flexneri* 2a [92], szczepionki opartej na antygenach, np. lipopolisacharyd/polisacharyd (LPS/PS) [75], czy białka błony zewnętrznej ściany komórkowej pałeczek *Shigella* [144].

Koszty związane z leczeniem shigelozy z użyciem antybiotyków są bardzo wysokie, zwłaszcza w krajach rozwijających się. Stąd też celowość prac nad szczepionkami przeciwko shigelozie wydaje się nie tylko zasadna, lecz również konieczna. Idealna szczepionka przeciwko czerewonc bakteryjnej, aby mogła skutecznie chronić przed rozwojem zakażenia, musi spełniać kilka podstawowych kryteriów. Przede wszystkim powinna wzbudzać długotrwałą odporność układu immunologicznego związanego z jelitem, nie wywołując przy tym objawów niepożądanych lub ograniczając je do minimum. Z ekonomicznego punktu widzenia koszt produkcji i dystrybucji idealnej szczepionki powinien być niewielki, ponieważ jej odbiorcy będą pochodzili przede wszystkim z krajów rozwijających się. Ponadto szczepionka taka powinna być także łatwa w podaniu i odporna na działanie czynników zewnętrznych, takich jak temperatura.

Szczepionki podjednostkowe

Zasadniczą cechą szczepionek podjednostkowych jest obecność w ich składzie antygeny charakterystycznego dla danego patogenu, który znajduje się na innym, przeważnie większym nośniku. Wykorzystanie w tego typu szczepionce tylko wybranego antygeny eliminuje ryzyko zakażenia poszczepionego, jakie istnieje w przypadku użycia całej komórki bakteryjnej.

W badaniach nad szczepionkami koniugatowymi opartymi na nośniku białkowym sprzężonym z O-swoistym polisacharydem pochodzącym z LPS *S. flexneri* 2a lub *S. sonnei*, uzyskano obiecujące wyniki. Podając je zarówno dzieciom (w wieku 4–7 lat), jak i dorosłym stwierdzono, że są bezpieczne i wywołują silną odpowiedź immunologiczną. Już po jednorazowym podaniu szczepionki uzyskiwano znaczny poziom swoistych przeciwciał klasy IgG.

Miano swoistych przeciwciał klasy IgM i IgA kształtowało się na nieco niższym poziomie [2,66,96,127]. Wykazano także ochronne właściwości kompleksu (Invaplex), którego składnikami były białka IpaB, IpaC, IpaD i LPS. Myszy i świnki morskie immunizowane oczyszczonym kompleksem tych inwazyj i LPS, były chronione przed letalną dawką wirulentnego szczepu *S. flexneri* [128]. Interesujące wydają się wyniki badań uzyskane przez Turbyfilla i wsp. [129], w których preparat Invaplex 50 zawierający skompleksowane IpaB, IpaC i LPS z *S. flexneri* 2a, zastosowany został u ludzi w badaniach przedklinicznych. Preparat ten podany w aerozolu donosowo, jednorazowo lub wielokrotnie w różnych dawkach, ogólnie był dobrze tolerowany, jedynie z niewielkimi, krótkotrwałymi objawami zapalnymi w obrębie miejsca podania i wzbudzał ochronną odpowiedź układu immunologicznego [129].

Doustne szczepionki zawierające zabite szczepy bakteryjne

Interesujących wyników dostarczyły próby zastosowania szczepionki, zawierającej zabite wysoką temperaturą szczepu *Shigella flexneri*. W badaniach modelowych na zwierzętach wykazano, że immunizacja królików czy świnek morskich zabitym patogenem zapewniała im całkowitą ochronę i 100% zwierząt przeżywało zakażenie żywym, wirulentnym patogenem tego samego gatunku [9,85]. Należy jednak zauważyć, że w przypadku świnek morskich immunizacja taka gwarantowała pełną ochronę jedynie w układzie homologicznym, natomiast nie chroniła zwierząt przed zakażeniem szczepem innego gatunku (*S. dysenteriae* 1). W surowicach immunizowanych zwierząt obecne były przeciwciała skierowane przeciw całej osłonie komórkowej bakterii i przeciw białkom błony zewnętrznej (OMP) [85]. Trzeba jednak podkreślić, że jeśli nawet wyniki badań nad tego typu szczepionką uzyskane na modelach zwierzęcych wydają się obiecujące, to potwierdzenie jej skuteczności w odniesieniu do organizmu ludzkiego jest, jak na razie, wciąż na etapie badań.

Żywe szczepionki atenuowane

Przygotowanie szczepionki składającej się z żywych nieinwazyjnych szczepów jest możliwe dzięki wprowadzaniu mutacji w obrębie chromosomu lub plazmidu wirulencji. Tak zmieniony szczep staje się niezdolny do inwazji i zakażenia organizmu, do którego zostaje wprowadzony. Delecja wprowadzona w kodowanym na chromosomie białku aroA oraz plazmidzie wirulencji VirG u *Shigella flexneri* 2a CVD 1203 pozwalała bakterii na wniknięcie do komórki gospodarza, ale chroniła go przed niekontrolowaną proliferacją oraz rozprzestrzenianiem się patogenu wewnątrz jego organizmu. Zaledwie dwie dawki bakterii po 10^9 CFU, podane w odstępach 2-tygodniowych świnkom morskim, powodowały wytwarzanie sIgA i zapewniały zwierzętom ochronę przed zakażeniem *S. flexneri* 2a [93]. Atenuowane szczepy *Shigella flexneri* w większości były bezpieczne dla człowieka i indukowały pewien stopień odpowiedzi immunologicznej. Jedną z najbardziej znanych i skutecznych szczepionek tego rodzaju jest szczepionka przygotowana przez wprowadzenie mutacji w plazmidzie wirulencji szczepu *Shigella flexneri* 2a Istrati T32. Szczep ten był w 100% bezpieczny dla człowieka i gwarantował 85% ochrony przed zakażeniem pałeczkami *Shigella flexneri*. Jednak wadą tej szczepionki

było to, że powinna być podawana wielokrotnie (w odstępach 6-miesięcznych) w dużych dawkach (10^{11} CFU) [83]. Innym brany pod uwagę szczepem atenuowanym jest *S. flexneri* 2a SC602 z delecją w genie icsA (odpowiedzialnym za rozprzestrzenianie się patogenu w organizmie gospodarza), znajdującym się na plazmidzie wirulencji oraz chromosomalnym *locus iuc* (kodującym aerobaktynę). Podanie tego szczepu w dawce nieprzekraczającej 10^8 CFU wywoływało jednak objawy chorobowe w postaci niewielkiej gorączki i słabej biegunki (u 2 spośród 15 pacjentów). Taka immunizacja ochotników stymulowała wytwarzanie przeciwciał, które chroniły ich przed rozwojem zakażenia w okresie poszczepiennym. Niemniej jednak stosowanie jej było obciążone ryzykiem związanym z doбором odpowiedniej dawki, zapewniającej odporność i niewywołującą ostrych objawów chorobowych [14].

Szczepionki hybrydowe

Innym podejściem do konstrukcji skutecznej szczepionki jest opracowanie szczepionki hybrydowej. Początki tworzenia szczepionki hybrydowej to lata 70 ubiegłego wieku. Głównym zadaniem szczepionki hybrydowej, podobnie jak w przypadku każdej skutecznej szczepionki, jest wzbudzenie odpowiedzi odpornościowej organizmu, która w pełni ochroni go przed zakażeniem. W skład takiej szczepionki może wchodzić żywy szczep jednego gatunku bakterii, będący nośnikiem materiału genetycznego innego gatunku bakterii. Przykładem takiej szczepionki było opracowanie hybrydy EcSf2a-1. Hybryda ta powstała dzięki przeniesieniu 140 MDa plazmidu wirulencji, kodującego antygeny związane z inwazyjnością bakterii *S. flexneri* 5a oraz chromosomalnych genów kodujących grupowo- i typowo-swoisty antygen O szczepu *S. flexneri* 2a do komórek *E. coli* K-12. Podanie szczepu hybrydowego w dawce 1×10^9 CFU wywoływało objawy chorobowe (gorączka, biegunka, czerwonka) u 31% wolontariuszy, którym podano pojedynczą dawkę. Szczepionka ta, podana w mniejszej dawce (5×10^6 – 5×10^7 CFU) nie zapewniała ochrony przeciwko zakażeniu szczepem *S. flexneri* 2a. Atenuowany mutant tej hybrydy (gen *aroD* – EcSf2a-2) podany małpom (w ilości $1,5 \times 10^{11}$ CFU), nie wywoływał u tych zwierząt żadnych skutków niepożądanych, w porównaniu z grupą placebo, której podano *E. coli* K-12. Stwierdzono, że szczepionka ta w porównaniu z grupą kontrolną zapewniała zwierzętom 60% ochrony przed rozwojem zakażenia pałeczkami *S. flexneri* 2a. U ludzi szczepionka EcSf2a-2 była wprawdzie dobrze tolerowana w dawce 5×10^6 – $2,1 \times 10^9$ CFU, aczkolwiek pojedyncza dawka $2,5 \times 10^9$ CFU wywoływała skutki niepożądane (gorączka, biegunka) u 17% badanych, a dawka $1,8 \times 10^{10}$ CFU była przyczyną czerwonki u 50% wolontariuszy. Trzykrotne podanie tej szczepionki w dawce $1,2 \times 10^9$ – $2,5 \times 10^9$ CFU, powodowało podwyższenie miana immunoglobulin przeciwko LPS (61%) i przeciw antygenom kodowanym przez plazmid wirulencji (44%) w surowicy. Wywoływało także podwyższenie miana immunoglobulin wydzielniczych IgA w jelicie, odpowiednio o 100% anty-LPS i o 60% w przypadku immunoglobulin skierowanych przeciwko antygenom kodowanym przez plazmid wirulencji. Chociaż szczepionka ta wzbudzała bardzo silną odpowiedź układu immunologicznego, to jej właściwości ochronne nie były zadowalające i kształtowały się na poziomie 36% [62]. Cohen i wsp. [12] badali skuteczność szczepionki składającej się

z oczyszczonego LPS z *S. sonnei* skoniugowanego z rekombinowanym białkiem toksyny A (*Ps. aeruginosa*) i preparat zawierający żywe atenuowane szczepy *E. coli* oraz *S. flexneri* 2a. Ochrona jaką uzyskali kształtowała się na poziomie 74% [12]. Pochodzący z *E. coli* gen *cs3* kodujący antygen CFA/II został przeniesiony w miejsce genu *asd* szczepu *S. flexneri* 2a T32, co powodowało dezaktywację genu *asd*. Niezależnie przeprowadzono klonowanie genu kodującego antygen O szczepu *S. sonnei* do wektora pXL378, otrzymując plazmid pXL390. Transformacja zmutowanego genu *asd* *S. flexneri* 2a T32 do pXL390, pozwoliła na otrzymanie biwalentnej szczepionki FS01 przeciwko *S. flexneri* 2a i *S. sonnei*. Uzyskane wyniki wykazały, że rekombinowany plazmid pXL390 był niezwykle stabilny w szczepie *asd* – T32. Szczep FS01 był zarówno stabilny pod względem genetycznym, jak i zdolny do ekspresji antygenów *Shigella* na powierzchni komórki, nie powodując przy tym toksyczności szczepu. Podanie podskórnie myszom szczepionki zawierającej FS01, pozwoliło na osiągnięcie 100% ochrony przed zakażeniem wywoływanym przez wirulentne szczepy *S. flexneri* 2a i *S. sonnei* [112].

Na marginesie omawianego tematu należy również zauważyć, że wspomniany wcześniej szczep Δ *asd* *S. flexneri* jest bardzo użytecznym wektorem dostarczającym szczepionki DNA do tkanek limfatycznych związanych z błoną śluzową. Wektor ten może mieć znakomite zastosowanie do konstrukcji szczepionek skierowanych nie tylko przeciwko pałeczkom *Enterobacteriaceae*. Po transfekcji plazmidu DNA wirusa odry (MV – measles virus) do Δ *asd* *S. flexneri* i zaszczepieniu nim myszy, które wcześniej przeszły zakażenie *Shigella flexneri* 2a, występuje ostra odpowiedź typu Th1 (wytwarzanie CD8⁺CTL i IFN- γ) oraz jest obniżona odpowiedź typu Th2 (niski poziom IgG i IgA w surowicy) [28]. Powierzchnia błony śluzowej jest bardzo ważnym miejscem indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusowi grypy. Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że atenuowany szczep *Shigella flexneri* Δ *asd* 15D, niosący konstrukt kodujący hemaglutyninę (HA) wirusa grypy, gwarantuje ochronę przeciwko śmiertelnej dawce wirusa grypy A/WSN/33. U zwierząt po immunizacji stwierdzono niskie miano populacji limfocytów T wytwarzających IFN- γ oraz obecność przeciwciał anti-HA klasy IgG. Po podaniu wirusa myszom immunizowanym atenuowanym szczepem *Shigella* zawierającym konstrukt HA, zauważalny był także wzrost miana przeciwciał anti-HA klasy IgA. Rezultaty te sugerują, że wektor Δ *asd* *S. flexneri* 15D może mieć podstawowe znaczenie w tworzeniu szczepionek DNA przeciwko wirusowi grypy jak i innych patogenów związanych z błonami śluzowymi [134]. Próby wykorzystania szczepu *Shigella flexneri* Δ *asd* 15D jako wektora w szczepionkach DNA, podejmowano także w ośrodkach naukowych zajmujących się opracowywaniem szczepionki przeciwko HIV. Zauważono bowiem, że donosowe podanie tego wektora myszom indukowało odpowiedź limfocytów T skierowaną przeciwko przenoszeniu się wirusa HIV drogą płciową [133].

Strategie opracowania szczepionki chroniącej w układzie heterologicznym

Z wcześniejszych badań wynika, że immunogenność *S. flexneri* zależy od serotypu tych bakterii, a szczepionka przeciwko określonemu serotypowi działa ochronnie w przypadku zakażenia szczepem homologicznym [85]. Wiadomo

również, że występowanie poszczególnych serotypów gatunku *S. flexneri* pozostaje w ścisłej korelacji z określonym regionem geograficznym, dlatego też przy opracowywaniu idealnej szczepionki przeciwko pałeczkom tego gatunku, należałoby tę zależność geograficzną uwzględnić. Wśród pałeczek należących do gatunku *S. flexneri* rozróżniamy 16 serotypów, które z wyjątkiem serotypu 6 mają identyczny, wspólny dla wszystkich szkielet cukrowy antygenu O. Jest on zbudowany z czterocukru, w skład którego wchodzi N-acetyloglukozamina i 3 cząsteczki ramnozy. Dodatkowa grupa glikozydowa i/lub O-acetylowa, którą może być podstawiony szkielet czterocukru, jest podstawą do wyróżnienia antygenów typowych (I–VI i X, Y) i grupowych (3,4; 6; 7,8,9), których występowanie determinuje określony serotyp bakterii *S. flexneri*. Każdy serotyp bakterii tego gatunku ma charakterystyczny zestaw antygenów typowych i grupowych. Często kilka różnych serotypów może mieć wspólne antygeny grupowe lub typowe [1].

Van De Verg i wsp. [131] wykazali, że w surowicach ludzi, którzy mieli kontakt z antygenem O-swoistym pałeczek *S. flexneri* 2a, obecne są przeciwciała klasy IgA, wykazujące reaktywność krzyżową z innymi serotypami tego gatunku bakterii. Może to wynikać z tego, że np. dla bakterii o serotypach 2a i 2b charakterystyczny jest ten sam antygen typowy II, a dla bakterii o serotypach 1a,5a i Y wspólny jest antygen grupowy 4 lub 3,4. Szczepy te zatem mają antygeny typowe- lub grupowo-swoiste wspólne z antygenem O szczepu *S. flexneri* 2a. Obecne w surowicach immunizowanych świnek morskich przeciwciała klasy IgA i IgG wykazywały reaktywność krzyżową ze szczepami o serotypach 1a,5a, i Y oraz nie reagowały ze szczepami o serotypie 2b. Krzyżowa reaktywność przeciwciał klasy IgG (silniejsza niż IgA) z bakteriami o serotypach 1a,2b i Y charakterystyczna była dla surowic immunizowanych małp. Rezultaty tych badań wskazują, że immunizacja antygenem O pochodzącym z *S. flexneri* 2a indukuje wytwarzanie przeciwciał o reaktywności krzyżowej. Przeciwciała te zdolne są do rozpoznawania podobnych antygenów występujących u różnych serotypów. Wyniki te sugerują także, że antygen ten mógłby zostać wykorzystany w poliwalentnej szczepionce przeciwko *S. flexneri* [131].

Badania przeprowadzone na świnkach morskich z użyciem szczepionki zawierającej atenuowane szczepy *S. flexneri* 2a CVD 1207 oraz *S. flexneri* 3a CVD 1211 wykazały, że wywołuje ona pewien stopień odporności na zakażenie pałeczkami *Shigella*. Obecne w surowicy przeciwciała wykazywały reaktywność krzyżową, a także chroniły immunizowane świnki morskie przed rozwojem zakażenia szczepami *S. flexneri* o serotypach 1b, 2b, 5b i Y. Natomiast nie uzyskano ochrony w przypadku zakażenia bakteriami tego gatunku o serotypach 1a, 4b [91]. Biorąc pod uwagę wszystkie uzyskane dotąd wyniki należy jednak podkreślić, że konieczne są dalsze szczegółowe badania, które pozwolą na dokładne określenie roli reaktywności krzyżowej w odpowiedzi immunologicznej człowieka przeciwko shigelozie.

BIAŁKA BŁONY ZEWNĘTRZNEJ (OMP) JAKO POTENCJALNE ANTYGENY W SZCZEPIONKACH KONIUGATOWYCH

Cechą charakterystyczną wszystkich bakterii Gram-ujemnych jest określona budowa osłony komórkowej. Osłona ta składa się z błony zewnętrznej (OM – outer

membrane) i wewnętrznej, czyli cytoplazmatycznej (IM – inner membrane) oddzielonych od siebie cienką warstwą peryplazmy zawierającej peptydoglikan (mureinę). Mimo że zarówno błona zewnętrzna, jak i wewnętrzna zbudowane są z warstwy lipidowej, w której usytuowane są białka, to ich właściwości i funkcje jakie pełnią w komórce różnią się zasadniczo. Jest to w głównej mierze związane ze środowiskiem zewnętrznym, z którym się stykają. Błona wewnętrzna sąsiaduje z cytoplazmą i warstwą peryplazmy, błona zewnętrzna graniczy z peryplazmą i środowiskiem zewnętrznym komórki. Najważniejszą funkcją błony zewnętrznej jest rola bariery, zapobiegającej wnikanii do komórki toksycznych substancji, takich jak antybiotyki czy sole żółciowe, co wydaje się mieć podstawowe znaczenie dla przetrwania bakterii w różnych środowiskach [114]. Transport substancji odżywczych do wnętrza komórki umożliwiają integralne białka błony zewnętrznej (OMPs – outer membrane proteins), zwane powszechnie porynami. Białka te tworzą w błonie zewnętrznej otwarte, wypełnione wodą kanały, które umożliwiają przemieszczanie się małych hydrofilowych cząsteczek, takich jak aminokwasy, czy węglowodany w wyniku biernego transportu. Białka błonowe pełnią wiele różnorodnych funkcji związanych m.in. z wydzielaniem innych białek czy usuwaniem z komórki substancji toksycznych i leków. Białka te są także enzymami [125]. Wszystkie składniki białek błony zewnętrznej są syntetyzowane w cytoplazmie lub wewnętrznej części IM, a następnie transportowane w kierunku OM. Podczas, gdy w większości integralnych białek błonowych, włączając w to białka błony wewnętrznej, występują struktury typu α -helisy, bakteryjne OMPs reprezentują zupełnie inne struktury. Białka te tworzą β -baryłki, złożone z naprzemiennie występujących amfipatycznych β -zwojów. Reszty hydrofobowe tych zwojów są wyeksponowane do lipidowego środowiska błony, podczas gdy reszty hydrofilowe tworzą wewnętrzny kanał, wypełniony wodą, umożliwiający migrację cząsteczek o podobnym charakterze [125]. Białka błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych mają podstawowe znaczenie dla wzrostu tych drobnoustrojów, zapewniając im przetrwanie w niekorzystnych warunkach, a także umożliwiając adhezję i inwazję do komórek gospodarza. Błona zewnętrzna bakterii i białka w niej występujące, to pierwsze elementy struktury ściany komórkowej bakterii, dzięki którym dochodzi do kontaktu z atakowanymi komórkami gospodarza. W związku z tym OMPs są brane pod uwagę jako potencjalne składniki szczepionek przeciw wielu zakażeniom wywołanym przez patogenne pałeczki jelitowe. Białka obecne w błonie zewnętrznej występują w postaci pojedynczych cząsteczek lub tworzą w niej kompleksy, zależne od kowalencyjnych lub niekowalencyjnych oddziaływań. Kompleksy te pełnią także ważną rolę w fizjologii i patogenezie bakterii [79]. Białka błony wewnętrznej bakterii są ważnymi z punktu widzenia immunogenności składnikami osłony komórkowej. Są one wyeksponowane na powierzchni patogenu i w związku z tym mają łatwy kontakt z komórkami zakażanego organizmu.

Jeżeli weźmiemy pod uwagę zagrożenie spowodowane zarówno wzrostem liczby zakażeń wywołanych przez pałeczki jelitowe na całym świecie i rosnącą lekooporność szczepów, a także udział białek błony zewnętrznej w patogenezie tych drobnoustrojów oraz ich właściwości immunostymulacyjne, to białka te mogą być doskonałymi składnikami szczepionek koniugatowych [82,104,106]. Badania

ostatnich lat pokazują, że OMP wyizolowane z patogennych drobnoustrojów mogą pełnić rolę antygenów szczepionki. Białka te bowiem, nie niosąc ryzyka wystąpienia zakażenia, wzbudzają odpowiedź układu immunologicznego i indukują działanie ochronne, a także utrudniają kolonizację, stając się realną bronią w walce z patogenami [57]. Konstrukcja szczepionki podjednostkowej przeciwko shigelozie opierać się powinna na odpowiedniej charakterystyce immunochemicznej antygeny, który po podaniu w postaci szczepionki będzie wzbudzał taką odpowiedź układu odpornościowego, która ochroni uodporniany organizm przed ewentualnym zakażeniem [129].

Analizy immunochemiczne głównych białek błony wewnętrznej *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* i *Shigella sonnei* wykazały wśród wszystkich czterech gatunków *Shigella*, podobny profil białkowy oraz reaktywność krzyżową [86,111,143]. Badania shigelozy prowadzone na modelu zwierzęcym sugerują, że główne białka o masie cząsteczkowej 35–38 kDa są dobrymi immunogenami i indukują ochronną odpowiedź immunologiczną [85, 111].

Białka błony zewnętrznej ściany komórkowej *Shigella flexneri* wzbudzają zarówno odpowiedź komórkową jak i humoralną. Doświadczenia przeprowadzone na nieimmunizowanych wcześniej zwierzętach potwierdzają, że podanie im limfocytów B i T pochodzących od myszy immunizowanych wieloskładnikowym preparatem OMP, chroniło je przed zakażeniem pałeczkami *Shigella*. U tych zwierząt odporność na zakażenie występowała już między 4 a 8 dniem po podaniu im komórek odpornościowych [148]. Natomiast immunizacja myszy preparatem białek błony zewnętrznej *S. flexneri* 3a stymulowała makrofagi zwierząt do fagocytozy pałeczek *Shigella flexneri* i *Salmonella Typhimurium* [17]. Bierna immunizacja myszy surowicą z przeciwciałami anti-OMP *Shigella flexneri* 3a, pochodzących od zwierząt szczepionych uprzednio preparatem OMP, chroniła w 100% zwierzęta przed zakażeniem zarówno szczepem homologicznym, jak i innymi bakteriami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae*. Co więcej, podanie nieimmunizowanym zwierzętom rozcieńczonej nawet 5000 razy surowicy, pochodzącej od zwierząt immunizowanych OMP, gwarantowało ochronę przed rozwojem zakażenia [145]. Wieloskładnikowy preparat OMP okazał się także skuteczny w stymulacji cytokin *in vitro*. Doświadczenia przeprowadzone na splenocytach i makrofagach myszy wykazały, że preparaty OMP wpływają na aktywność cytokin prozapalnych (TNF, IL-6 i IL-2), stymulujących podziały limfocytów B, T i NK, a także wzbudzających aktywność innych cytokin [18,19].

Badania Sansonettiego i Phalipon [117] potwierdziły, że podczas naturalnej infekcji pałeczkami *Shigella* dochodzi do wzmożonego wydzielania lokalnych immunoglobulin sIgA, a także surowicznych IgG, swoistych dla kilku białek należących do OMP. Nie zauważono jednak podczas zakażenia wytwarzania przeciwciał IgM skierowanych przeciwko OMP [117].

Jednym z białek błony zewnętrznej ściany komórkowej pałeczek *Shigella flexneri* branych pod uwagę jako potencjalny antygen w szczepionce koniugatowej, jest zaliczane do tzw. białek głównych (major protein) białko o masie 38 kDa (OMP-38). Białko to jest rozpoznawane przez

ludzkie przeciwciała klasy IgG i IgA, a jego immunoreaktywność z przeciwciałami obecnymi w ludzkiej surowicy jest charakterystyczna dla białka OMP-38 z *Shigella flexneri* (z wyjątkiem serotypu 6) oraz OMP z *E. coli*, *Citrobacter*, *Hafnia* i innych szczepów należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Ponadto stwierdzono występowanie przeciwciał anti-OMP-38 w surowicach krwiodawców, a także w surowicy pępowinowej, co może sugerować ich charakter ochronny [146].

Wyniki badań dotyczące białka OMP-38 są obiecujące i stwarzają nadzieję na wykorzystanie go w szczepionce nie tylko przeciwko pałeczkom *Shigella flexneri* 3a, z których zostało wyizolowane, ale także skierowanej przeciwko pozostałym szczepom *Shigella* i gatunkom należącym do rodziny *Enterobacteriaceae*. Jednocześnie białko to może służyć jako specyficzny marker niedoborów odpornościowych, a także wskaźnik rozwoju odporności antybakteryjnej [146].

PIŚMIENICTWO

- [1] Allison G.E., Verma N.K.: Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol.*, 2000; 8: 17–23
- [2] Ashkenazi S., Passwell J.H., Harlev E., Miron D., Dagan R., Farzan N., Ramon R., Majadly F., Bryla D.A., Karpas A.B., Robbins J.B., Schneerson R.: Safety and immunogenicity of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2a O-specific polysaccharide conjugates in children. *J. Infect. Dis.*, 1999; 179: 1565–1568
- [3] Aslanzadeh J.: Biochemical profile-based microbial identification systems. W: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, t. 1, red.: Tang Y.W., Stratton C. W. Springer, Nashville, 2006; 84–116
- [4] Badge R.M., Brookfield J.F.: The role of host factors in the population dynamics of selfish transposable elements. *Theor. Biol.*, 1997; 187: 261–271
- [5] Barquet N., Domingo P.: Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann. Intern. Med.*, 1997; 127: 635–642
- [6] Biet F., Loch C., Kremer L.: Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J. Mol. Med.*, 2002; 80: 147–162
- [7] Bischoff K.M., White D.G., McDermott P.F., Zhao S., Gaines S., Maurer J.J., Nisbet D.J.: Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40: 389–394
- [8] Boyd E.F., Davis B.M., Hochhut B.: Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 137–144
- [9] Chakrabarti M.K., Bhattacharya J., Bhattacharya M.K., Nair G.B., Bhattacharya S.K., Mahalanabis D.: Killed oral *Shigella vaccine* made from *Shigella flexneri* 2a protects against challenge in the rabbit model of shigellosis. *Acta Paediatr.*, 1999; 88: 161–165
- [10] Cheng A.C., McDonald J.R., Thielman N.M.: Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2005; 39: 757–773
- [11] Clemens J.D., Stanton B., Stoll B., Shahid N.S., Banu H., Chowdhury A.K.: Breastfeeding as a determinant of severity in shigellosis: evidence for protection throughout the first three years of life in Bangladeshi children. *Am. J. Epidemiol.*, 1986; 123: 710–720
- [12] Cohen D., Ashkenazi S., Green M.S., Gdalevich M., Robin G., Slepion R., Yavzori M., Orr N., Block C., Ashkenazi I., Shemer J., Taylor D.N., Hale T.L., Sadoff J.C., Pavliakova D., Schneerson R., Robbins J.B.: Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet*, 1997; 18: 155–159
- [13] Cohen D., Block C., Green M.S., Lowell G.H., Ofek I.: Immunoglobulin M, A and G antibody response to lipopolysaccharide O antigen in symptomatic and asymptomatic *Shigella* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1989; 27: 162–167
- [14] Coster T.S., Hoge C.W., VanDeVerg L.L., Hartman A.B., Oaks E.V., Venkatesan M.M., Cohen D., Robin G., Fontaine-Thompson A., Sansonetti P.J., Hale T.L.: Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 3437–3443
- [15] Cryz S.J. Jr, Mortimer P., Cross A.S., Fürer E., Germanier R.: Safety and immunogenicity of a polyvalent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine in humans. *Vaccine*, 1986; 4: 15–20
- [16] Cummings J.H., Macfarlane G.T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 1991; 70: 443–459
- [17] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Phagocytic and bactericidal properties of macrophages of mice immunized with outer membrane proteins (OMP) of *Shigella*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1988; 36: 701–709
- [18] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Induction of tumor necrosis factor and interleukin 6 by outer membrane proteins of *Shigella* in spleen cells and macrophages of mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1993; 41: 153–157
- [19] Czarny A., Witkowska D., Mulczyk M.: Effect of outer membrane proteins (OMP) of *Shigella* on interleukin 2 (IL-2) production by spleen cells of mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1994; 42: 159–161
- [20] Dare D.: Rapid bacterial characterization and identification by MALDI-TOF mass spectrometry. W: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, t. 1, red.: Tang Y.W., Stratton C. W. Springer, Nashville, 2006; 117–133
- [21] Dart R.K.: *Microbiology for the Analytical Chemist*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996
- [22] Duménil D., Olivo J.C., Pellegrini S., Fellous M., Sansonetti P.J., Tran Van Nhieu G.: Interferon α inhibits a Src-mediated pathway necessary for *Shigella*-induced cytoskeletal rearrangements in epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 1998; 143: 1003–1012
- [23] Dunne E.F., Fey P.D., Kludt P., Reporter R., Mostashari F., Shillam P., Wicklund J., Miller C., Holland B., Stamey K., Barrett T.J., Rasheed J.K., Tenover F.C., Ribot E.M., Angulo F.J.: Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *JAMA*, 2000; 284: 3151–3156
- [24] DuPont H.L., Hornick R.B., Snyder M.J., Libonati J.P., Formal S.B., Gangarosa E.J.: Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection. *J. Infect. Dis.*, 1972; 125: 12–16
- [25] Ericsson C.D.: Travellers' diarrhoea. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003; 21: 116–124
- [26] Espina M., Olive A.J., Kenjale R., Moore D.S., Ausar S.F., Kaminski R.W., Oaks E.V., Middaugh C.R., Picking W.D., Picking W.L.: IpaD localizes to the tip of the Type III Secretion System needle of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 2006; 74: 4391–4400
- [27] Evans D.G., Graham D.Y., Evans D.J. Jr: Administration of purified colonization factor antigens (CFA/I, CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. Response to challenge with virulent enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology*, 1984; 87: 934–940
- [28] Fennelly G.J., Khan S.A., Abadi M.A., Wild T.F., Bloom B.R.: Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J. Immunol.*, 1999; 162: 1603–1610
- [29] Ferreccio C., Prado V., Ojeda A., Cayayazo M., Abrego P., Guers L., Levine M.M.: Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.*, 1991; 134: 614–627
- [30] Finney M., Smullen J., Foster H.A., Brox S., Storey D.M.: Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* from faecal samples from healthy subjects. *J. Microbiol. Meth.*, 2003; 54: 353–358
- [31] Formal S.B., Oaks E.V., Olsen R.E., Wingfield-Eggleston M., Snoy P.J., Cogan J.P.: Effect of prior infection with virulent *Shigella flexneri* 2a on the resistance of monkeys to subsequent infection with *Shigella sonnei*. *J. Infect. Dis.*, 1991; 164: 533–537
- [32] Gamian A., Witkowska D., Mieszala M., Staniszevska M., Przondo-Mordarska A.: Fimbriae as a Carrier for antibacterial vaccines. *Nova Acta Leopoldina*, 1999; 80: 265–272
- [33] Girard M.P., Steele D., Chaignat C.L., Kiény M.P.: A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*, 2006; 24: 2732–2750
- [34] Girón J.A.: Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Mol. Microbiol.*, 1995; 18: 63–75
- [35] Gomez H.F., Ochoa T.J., Carlin L.G., Cleary T.G.: Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. *J. Infect. Dis.*, 2003; 187: 87–95

- [36] Gómez-Duarte O.G., Bai J., Newell E.: Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2009; 63: 1–9
- [37] Goñi-Urriza M., Capdepuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P., Quentin C.: Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66: 125–132
- [38] Górka S., Jarzab A., Gamian A.: Bakterie probiotyczne w przewodzie pokarmowym człowieka jako czynnik stymulujący układ odpornościowy. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2009; 63: 653–667
- [39] Guerrant R.L., Kosek M., Moore S., Lorentz B., Brantley R., Lima A.A.: Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch. Med. Res.*, 2002; 33: 351–355
- [40] Guichon A., Hersh D., Smith M.R., Zychlinsky A.: Structure-function analysis of the *Shigella* virulence factor IpaB. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 1269–1276
- [41] Guttman J.A., Finlay B.B.: Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 2008; 16: 535–542
- [42] Haas M.J., Dowding J.E.: Aminoglycoside-modifying enzymes. *Methods Enzymol.*, 1975; 43: 611–628
- [43] Hale Boothe D.D., Smith M.C., Gattie D.K., Das K.C.: Characterization of microbial populations in landfill leachate and bulk samples during aerobic bioreduction. *Adv. Environ. Res.*, 2001; 5: 285–294
- [44] Han J.: Molecular differential diagnoses of infectious diseases: is the future now? W: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, t. 1, red.: Tang Y.W., Stratton C. W. Springer, Nashville, 2006; 472–504
- [45] Hardegen C., Messler S., Henrich B., Pfeffer K., Würthner J., MacKenzie C.R.: A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2010; 9: 5
- [46] Hathaway L.J., Griffin G.E., Sansonetti P.J., Edgeworth J.D.: Human monocytes kill *Shigella flexneri* but then die by apoptosis associated with suppression of proinflammatory cytokine production. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 3833–3842
- [47] Hayward R.D., Cain R.J., McGhie E.J., Phillips N., Garner M.J., Koronakis V.: Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 590–603
- [48] Hodgkinson J.L., Horsley A., Stabat D., Simon M., Johnson S., da Fonseca P.C., Morris E.P., Wall J.S., Lea S.M., Blocker A.J.: Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 477–485
- [49] Hong Y., Liu T., Lee M.D., Hofacre C.L., Maier M., White D.G., Ayers S., Wang L., Berghaus R., Maurer J.J.: Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiol.*, 2008; 8: 178
- [50] Huilan S., Zhen L.G., Mathan M.M., Mathew M.M., Olarte J., Espejo R., Khin Maung U., Ghafoor M.A., Khan M.A., Sami Z., Sutton R.G.: Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull. World Health Organ.*, 1991; 69: 549–555
- [51] Iijima H., Takahashi I., Kiyono H.: Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.*, 2001; 11: 117–133
- [52] Ishii Y., Kimura S., Alba J., Shiroto K., Otsuka M., Hashizume N., Tamura K., Yamaguchi K.: Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 1072–1075
- [53] Islam D., Christensson B.: Disease dependent changes in T-cell populations in patients with shigellosis. *APMIS*, 2000; 108: 251–260
- [54] Islam D., Veress B., Bardhan P.K., Lindberg A.A., Christensson B.: Quantitative assessment of IgG and IgA subclass producing cells in rectal mucosa during shigellosis. *J. Clin. Pathol.*, 1997; 50: 513–520
- [55] Jacoby G.A., Medeiros A.A.: More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991; 35: 1697–1704
- [56] Jarlier V., Nicolas M.H., Fournier G., Philippon A.: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 1988; 10: 867–878
- [57] Kawai K., Liu Y., Ohnishi K., Oshima S.: A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*, 2004; 22: 3411–3418
- [58] Kim S., Kim J., Kang Y., Park Y., Lee B.: Occurrence of extended spectrum beta-lactamases in members of the genus *Shigella* in the Republic of Korea. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 5264–5269
- [59] Klee S.R., Tzschaschel B.D., Singh M., Fält I., Lindberg A.A., Timmis K.N., Guzmán C.A.: Construction and characterization of genetically marked bivalent anti-*Shigella dysenteriae* 1 and anti-*Shigella flexneri* Y live vaccine candidates. *Microb. Pathog.*, 1997; 22: 363–376
- [60] Kobayashi N., Nishino K., Yamaguchi A.: Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5639–5644
- [61] Kohler H., Rodrigues S.P., McCormick B.A.: *S. flexneri* interactions with the basolateral membrane domain of polarized model intestinal epithelium: role of LPS in cell invasion and in activation of the mitogen activated protein kinase ERK. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 1150–1158
- [62] Kotloff K.L., Herrington D.A., Hale T.L., Newland J.W., Van De Verg L., Cogan J.P., Snoy P.J., Sadoff J.C., Formal S.B., Levine M.M.: Safety, immunogenicity, and efficacy in monkeys and humans of invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid vaccine candidates expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2218–2224
- [63] Kotloff K.L., Noriega F., Lososky G.A., Szein M.B., Wasserman S.S., Nataro J.P., Levine M.M.: Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 4542–4548
- [64] Kramer T.T., Roof M.B., Matheson R.R.: Safety and efficacy of an attenuated strain *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, 53: 444–448
- [65] Kruger T., Szabo D., Keddy K.H., Deeley K., Marsh J.W., Hujer A.M., Bonomo R.A., Paterson D.L.: Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 4263–4270
- [66] Kubler-Kielb J., Vinogradov E., Mocca C., Pozsgay V., Coxon B., Robbins J.B., Schneerson R.: Immunochemical studies of *Shigella flexneri* 2a and 6, and *Shigella dysenteriae* type 1 O-specific polysaccharide-core fragments and their protein conjugates as vaccine candidates. *Carbohydr. Res.*, 2010; 345: 1600–1608
- [67] Laupland K.B., Schonheyder H.C., Kennedy K.J., Lyytikäinen O., Nalquette L., Galbraith J., Collignon P., International Bacteremia Surveillance Collaborative.: *Salmonella enterica* bacteraemia: A multi-national population-based cohort study. *BMC Infect. Dis.*, 2010; 10: 95–100
- [68] Levine M.M., Kaper J.B., Black R.E., Clements M.L.: New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.*, 1983; 47: 510–550
- [69] Lindell S.S., Quinn P.: Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1975; 1: 440–443
- [70] Lipps G.: *Plasmids: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, 2008, University of Bayreuth, Germany, 2008
- [71] Livermore D.M., Brown D.F.: Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001; 48: 59–64
- [72] Lombard M., Pastoret P.P., Moulin A.M.: A brief history of vaccines and vaccination. *Rev. Sci. Tech.*, 2007; 26: 29–48
- [73] López-Gigosos R., García-Fortea P., Reina-Doña E., Plaza-Martín E.: Effectiveness in prevention of travellers' diarrhoea by an oral cholera vaccine WC/rBS. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2007; 5: 380–384
- [74] Louie M., Louie L., Simor A.E.: The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*, 2000; 163: 301–309
- [75] Lowell G.H., Kaminski R.W., Grate S., Hunt R.E., Charney C, Zimmer S., Colleton C.: Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 1706–1713
- [76] Lumsden J.S., Wilkie B.N., Clarke R.C.: Resistance to fecal shedding in pigs and chickens vaccinated with an aromatic depend mutant of *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, 52: 1784–1787
- [77] Mac Aogáin M., Mooij M.J., Adams C., Clair J., O'Gara F.: Emergence of extended-spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes among Irish multidrug-resistant isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010; 67:106–109
- [78] Mackay I. M.: *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2007
- [79] Macmillan H., Norimine J., Brayton K.A., Palmer G.H., Brown W.C.: Physical linkage of naturally complexed bacterial outer membrane proteins enhances immunogenicity. *Infect. Immun.*, 2008; 76: 1223–1229

- [80] Mandic-Mulec I., Weiss J., Zychlinsky A.: *Shigella flexneri* is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 110–115
- [81] Mandine E., Salles M.F., Zalisz R., Guenounou M., Smets P.: Murine monoclonal antibodies to *Klebsiella pneumoniae* protect against lethal endotoxemia and experimental infection with capsulated *K. pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1990; 58: 2828–2833
- [82] Marlovits T.C., Kubori T., Sukhan D.R., Thomas D.R., Galán J.E., Unger V.M.: Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 2004; 306: 1040–1042
- [83] Meitert T., Pencu E., Ciudin L., Tonciu M.: Vaccine strain *Sh. flexneri* T32-Istrati. Studies in animals and in volunteers. Antidysentery immunoprophylaxis and immunotherapy by live vaccine Vadizen (*Sh. flexneri* T32-Istrati). *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.*, 1984; 43: 251–278
- [84] Mel D.M., Arsic B.L., Nikolic B.D., Radovanic M.L.: Studies on vaccination against bacillary dysentery. 4. Oral immunization with live monotypic and combined vaccines. *Bull. World Health Organ.*, 1968; 39: 375–380
- [85] Mukhopadhyaya A., Mahalanabis D., Khanam J., Chakrabarti M.K.: Protective efficacy of oral immunization with heat-killed *Shigella flexneri* 2a in animal model: study of cross protection, immune response and antigenic recognition. *Vaccine*, 2003; 21: 3043–3050
- [86] Mulczyk M., Adamus G., Witkowska D., Romanowska E.: Studies on virulence of *Shigella flexneri*. Protective effect of outer membrane proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1981; 29: 85–90
- [87] Munday C.J., Whitehead G.M., Todd N.J., Campbell M., Hawkey P.M.: Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in York, UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004; 54: 628–633
- [88] Nataro J.P., Mai V., Johnson J., Blackwelder W.C., Heimer R., Tirrell S., Edberg S.C., Braden C.R., Glenn Morris J. Jr, Hirshon J.M.: Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, New Haven, Connecticut. *Clin. Infect. Dis.*, 2006; 43: 402–407
- [89] Nato F., Phalipon A., Nguyen T.L., Diep T.T., Sansonetti P., Germani Y.: Dipstick for rapid diagnosis of *Shigella flexneri* 2a in stool. *PLoS One*, 2007; 2: e361
- [90] Nikaido H.: Bacterial resistance to antibiotics as a function of outer membrane permeability. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1988; 22, Suppl. A: 17–22
- [91] Noriega F.R., Liao F.M., Maneval D.R., Ren S., Formal S.B., Levine M.M.: Strategy for cross-protection among *Shigella flexneri* serotypes. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 782–788
- [92] Noriega F.R., Losonsky G., Wang J.Y., Formal S.B., Levine M.M.: Further characterization of delta aroA delta virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 23–27
- [93] Noriega F.R., Wang J.Y., Losonsky G., Maneval D.L., Hone D.M., Levine M.M.: Construction and characterization of attenuated delta aroA delta virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 5168–5172
- [94] Oberhelman R.A., Kopecko D.J., Salazar-Lindo E., Gotuzzo E., Buysse J.M., Venkatesan M.M., Fernandez-Prada C., Guzman M., Leon-Barua R., Sack R.B.: Prospective study of systemic and mucosal immune responses in dysenteric patients to specific *Shigella* invasion plasmid antigens and lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, 1991; 59: 2341–2350
- [95] O'Hara C.M.: Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic Gram-negative bacilli. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005; 18: 147–162
- [96] Passwell J.H., Harlev E., Ashkenazi S., Chu C., Miron D., Ramon R., Farzan N., Shiloach J., Bryla D.A., Majadly F., Roberson R., Robbins J.B., Schneerson R.: Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults in Israel. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 1351–1357
- [97] Paterson D.L.: Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Med.*, 2006; 119: S20–S28
- [98] Paterson D.L., Hujer K.M., Hujer A.M., Yeiser B., Bonomo M.D., Rice L.B., Bonomo R.A.; International Klebsiella Study Group.: Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 3554–3560
- [99] Paterson D.L., Ko W.C., Von Gottberg A., Mohapatra S., Casellas J.M., Goossens H., Mulazimoglu L., Trenholme G., Klugman K.P., Bonomo R.A., Rice L.B., Wagener M.M., McCormack J.G., Yu V.L.: International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann. Intern. Med.*, 2004; 140: 26–32
- [100] Pendaries C., Tronchère H., Arbibe L., Mounier J., Gozani O., Cantley L., Fry M.J., Gaits-Iacovoni F., Sansonetti P.J., Payrastré B.: PtdIns(5)P activates the host cell PI3-kinase/akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *EMBO J.*, 2006; 25: 1024–1034
- [101] Petroni A., Corso A., Melano R., Cacace M.L., Bru A.M., Rossi A., Galas M.: Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002; 46: 1462–1468
- [102] Phalipon A., Cardona A., Kraehenbuhl J.P., Edelman L.R., Sansonetti P.J., Corthesy B.: Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. *Immunity*, 2002; 17: 107–115
- [103] Poole K.: Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.*, 2002; 92: 55S–64S
- [104] Ram P.K., Crump J.A., Gupta S.K., Miller M.A., Mintz E.D.: Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiol. Infect.*, 2008; 136: 577–603
- [105] Ramarao N., Le Clainche C., Izard T., Bourdet-Sicard R., Ageron E., Sansonetti P.J., Carlier M., Van Nhieu G.T.: Capping host actin filaments by vinculin activated by the *Shigella* IpaA carboxyl-terminal domain. *FEBS Lett.*, 2007, 581: 853–857
- [106] Raqib R., Lindberg A.A., Wretling B., Bardhan P.K., Andersson U., Andersson J.: Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 289–296
- [107] Reier-Nilsen T., Farstad T., Nakstad B., Lauvrak V., Steinbakk M.: Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr.*, 2009; 9: 5
- [108] Reis R.S., Horn F.: Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathog.*, 2010; 2: 8
- [109] Robin G., Keisari Y., Slepion R., Ashkenazi S., Cohen D.: Quantitative analysis of IgG class and subclass and IgA serum response to *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2a polysaccharides following vaccination with *Shigella* conjugate vaccines. *Vaccine*, 1999; 17: 3109–3115
- [110] Rohde J.R., Breikreutz A., Chenal A., Sansonetti P.J., Parsot C.: Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host Microbe*, 2007; 1: 77–83
- [111] Roy S., Das A.B., Ghosh A.N., Biswas T.: Purification, pore-forming ability, and antigenic relatedness of the major outer membrane protein of *Shigella dysenteriae* type 1. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 4333–4338
- [112] Rui X., Xu Y., Wan H., Su G., Huang C.: Construction of a stable and non-resistant bivalent vaccine candidate strain against *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei*. *Chin. J. Biotechnol.*, 1996; 12: 89–97
- [113] Ruiz J.: Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003; 51: 1109–1117
- [114] Ruiz N., Kahne D., Silhavy T.J.: Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006; 4: 57–66
- [115] Salminen S., Isolauri E., Onnela T.: Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy*. 1995; 41(Suppl.1): 5–15
- [116] Sansonetti P.J., Arondel J., Huerre M., Harada A., Matsushima K.: Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 1471–1480
- [117] Sansonetti P., Phalipon A.: Shigellosis: from molecular pathogenesis of infection to protective immunity and vaccine development. *Res. Immunol.*, 1996; 147: 595–602
- [118] Schroeder G.N., Hilbi H.: Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008; 21: 134–156
- [119] Silva J.: Mechanisms of antibiotic resistance. *Curr. Ther. Res.*, 1996; 57: 30–35
- [120] Singer M., Sansonetti P.J.: IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of *Shigella*-induced colitis. *J. Immunol.*, 2004, 173: 4197–4206
- [121] Skoudy A., Nhieu G.T., Mantis N., Arpin M., Mounier J., Gounon P., Sansonetti P.J.: A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 1999; 112: 2059–2068

- [122] Staniszewska M., Witkowska D., Gamian A.: Fimbrie jako czynnik patogenności bakterii i nośnik w szczepionkach koniugatowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2000; 54: 727–747
- [123] Suzuki T., Franchi L., Toma C., Ashida H., Ogawa M., Yoshikawa Y., Mimuro H., Inohara N., Sasaki C., Nuñez G.: Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella* infected macrophages. *PLoS Pathog.*, 2007; 3: e111
- [124] Taylor D.N., Trofa A.C., Sadoff J., Chu C., Bryla D., Shiloach J., Cohen D., Ashkenazi S., Lerman Y., Egan W., Schneerson R., Robbins J.B.: Synthesis, characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella flexneri* type 2a, and *Shigella sonnei* (*Plesiomonas shigelloides*) bound to bacterial toxoids. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 3678–3687
- [125] Tommassen J.: Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. *Microbiology*, 2010; 156: 2587–2596
- [126] Tran Van Nhieu G., Caron E., Hall A., Sansonetti P.J.: IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.*, 1999; 18: 3249–3262
- [127] Tribble D., Kaminski R., Cantrell J., Nelson M., Porter C., Baqar S., Williams C., Arora R., Saunders J., Ananthakrishnan M., Sanders J., Zaucha G., Turbyfill R., Oaks E.: Safety and immunogenicity of a *Shigella flexneri* 2a Invaplex 50 intranasal vaccine in adult volunteers. *Vaccine*, 2010; 28: 6076–6085
- [128] Turbyfill K.R., Hartman A.B., Oaks E.V.: Isolation and characterization of a *Shigella flexneri* invasin complex subunit vaccine. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6624–6632
- [129] Turbyfill K.R., Kaminski R.W., Oaks E.V.: Immunogenicity and efficacy of highly purified invasin complex vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine*, 2008; 26: 1353–1364
- [130] Van Baar B.L.: Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000; 24: 193–219
- [131] Van De Verg L.L., Bendiuk N.O., Kotloff K., Marsh M.M., Ruckert J.L., Puryear J.L., Taylor D.N., Hartman A.B.: Cross-reactivity of *Shigella flexneri* serotype 2a O antigen antibodies following immunization or infection. *Vaccine*, 1996; 14: 1062–1068
- [132] Van De Verg L.L., Mallett C.P., Collins H.H., Larsen T., Hammack C., Hale T.L.: Antibody and cytokine responses in a mouse pulmonary model of *Shigella flexneri* serotype 2a infection. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 1947–1954
- [133] Vecino W.H., Morin P.M., Agha R., Jacobs W.R. Jr, Fennelly G.J.: Mucosal DNA vaccination with highly attenuated *Shigella* is superior to attenuated *Salmonella* and comparable to intramuscular DNA vaccination for T cells against HIV. *Immunol. Lett.*, 2002; 82: 197–204
- [134] Vecino W.H., Quanquin N.M., Martinez-Sobrido L., Fernandez-Sesma A., García-Sastre A., Jacobs W.R. Jr, Fennelly G.J.: Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge. *Virology*, 2004; 325: 192–199
- [135] Von Seidlein L., Kim D.R., Ali M., Lee H., Wang X., Thiem V.D., Canh do G., Chaicumpa W., Agtini M.D., Hossain A., Bhutta Z.A., Mason C., Sethabutr O., Talukder K., Nair G.B., Deen J.L., Kotloff K., Clemens J.: A multicentre study of *Shigella diarrhoea* in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med.*, 2006; 3: e353
- [136] Watanabe T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1963; 27: 87–115
- [137] Way S.S., Borczuk A.C., Dominitz R., Goldberg M.B.: An essential role for gamma interferon in innate resistance to *Shigella flexneri* infection. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 1342–1348
- [138] Way S.S., Borczuk A.C., Goldberg M.B.: Adaptive immune response to *Shigella flexneri* 2a cydC in immunocompetent mice and mice lacking immunoglobulin A. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 2001–2004
- [139] Way S.S., Borczuk A.C., Goldberg M.B.: Thymic independence of adaptive immunity to the intracellular pathogen *Shigella flexneri* serotype 2a. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 3970–3979
- [140] Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D., Weiss J., Zychlinsky A.: Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, 2002; 417: 91–94
- [141] Wiegand I., Geiss H.K., Mack D., Stürenburg E., Seifert H.: Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 1167–1174
- [142] Williamson R.: Resistance of *Clostridium perfringens* to beta-lactam antibiotics mediated by a decreased affinity of a single essential penicillin-binding protein. *J. Gen. Microbiol.*, 1983; 129: 2339–2342
- [143] Witkowska D., Adamus G., Mulczyk M., Romanowska E.: Outer membrane protein composition of *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1982; 13: 109–111
- [144] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2009; 63: 176–199
- [145] Witkowska D., Czarny A., Mulczyk M.: Humoral response in mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1986; 34: 499–504
- [146] Witkowska D., Masłowska E., Staniszewska M., Szostko B., Jankowski A., Gamian A.: Enterobacterial 38-kDa outer membrane protein is an age-dependent molecular marker of innate immunity and immunoglobulin deficiency as results from its reactivity with IgG and IgA antibody. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006; 48: 205–214
- [147] Witkowska D., Mieszala M., Gamian A., Staniszewska M., Czarny A., Przondo-Mordarska A., Jaquinod M., Forest E.: Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella fimbriae* are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunological characterization. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005; 45: 221–230
- [148] Witkowska D., Mleczo J., Mulczyk M.: Transfer of immunity by means of spleen cells from mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1985; 33: 629–635
- [149] Wu F., Della-Latta P.: Pulsed-field gel electrophoresis. W: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, t. 1, red.: Tang Y.W., Stratton C. W. Springer, Nashville 2006, 143–157
- [150] Xiang Y., Han W.: Bacterial identification based on 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. W: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, t. 1, red.: Tang Y.W., Stratton C. W. Springer, Nashville, 2006; 323–332
- [151] Yokochi T., Inoue Y., Kato Y., Sugiyama T., Jiang GZ., Kawai M., Fukada M., Takahashi K.: Strong adjuvant action of *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide and its inhibition of systemic anaphylaxis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1995; 10: 181–184
- [152] Yoshida S., Handa Y., Suzuki T., Ogawa M., Suzuki M., Tamai A., Abe A., Katayama E., Sasaki C.: Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. *Science*, 2006; 314: 985–989
- [153] Zwillich S.H., Duby A.D., Lipsky, P.E.: T-lymphocyte clones responsive to *Shigella flexneri*. *J. Clin. Microbiol.*, 1989; 27: 417–421
- [154] Zychlinsky A., Prevost M.C., Sansonetti P.J.: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 1992; 358: 167–169

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.