Aleksandra Anna Zasada

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego

- Państwowy Zakład Higieny

AUTOREFERAT

Warszawa, grudzień 2013 r.

Autoreferat

„Analiza czynników wpływających na występowanie i rozwój zakażeń *Corynebacterium diphtheriae*, ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń szczepami nie wytwarzającymi toksyny błoniczej"

1. Imię i nazwisko: Aleksandra Anna Zasada

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

   - magister biologii, specjalność mikrobiologia – Warszawa, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, 2001 r.

   Praca magisterska pt.: „Udział dwuskładnikowego systemu regulacji OmpR/EnvZ w ekspresji genów wirulencji *Yersinia enterocolitica* serotyp O:9. Konstrukcja mutantów w genie *ompR Y. enterocolitica* metodą 'gene-replacement'".

   - doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej – Warszawa, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, 2006 r.

   Rozprawa doktorska pt. „Ocena przydatności wybranych chromosamalnych markerów do identyfikacji *Bacillus anthracis*".

   - specjalizacja w dziedzinie Zdrowie Publiczne – Warszawa, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2008 r.

   - Certified Project Management Associate IPMA Level D – Warszawa, Biuro Certyfikacji IPMA Polska, 2013 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

   od 03.09.2001 r. do chwili obecnej jestem zatrudniona w Zakładzie Bakteriologii, Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie, (początkowo na stanowisku biologa, od 01.04.2003 r. na stanowisku asystenta, od 01.08.2007 r. na stanowisku adiunkta)

   - od 01.02.2008 r. do 31.01.2011 r. pełniłam funkcję Kierownika Pracowni Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Układu Oddechowego w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH

- od 26.10.2010 r. pełnię funkcję Pełnomocnika ds. Bezpieczeństwa Laboratorium BSL-3 NIZP-PZH

- od 01.02.2011 r. pełnię funkcję Kierownika Pracowni Badania Bakterii Wysoce Chorobotwórczych.

W okresie od początku zatrudnienia do chwili obecnej:

- byłam autorem lub współautorem:

  - 19 publikacji w czasopismach posiadających IF, w tym 14 po doktoracie (wykaz opublikowanych prac tabela I B poz. 1-4, 6-7, 9 oraz tabela II A) – sumaryczny IF 42,855 w tym po doktoracie IF 35,638

  - 23 publikacji naukowych w czasopismach nie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, w tym 12 po doktoracie (wykaz opublikowanych prac tabela I B poz. 5, 8, 10 oraz tabela II D)

  - 33 doniesień i referatów na zjazdach naukowych, w tym 18 po doktoracie (wykaz tabela II K oraz tabela III B)

- kierowałam lub brałam udział w 4 projektach międzynarodowych i 7 krajowych – w tym po doktoracie w 4 projektach międzynarodowych i 6 krajowych (Wykaz tabela II, I)

4. Wykazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

   a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego, (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

„Analiza czynników wpływających na występowanie i rozwój zakażeń *Corynebacterium diphtheriae*, ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń szczepami nie wytwarzającymi toksyny błoniczej"

1. **Zasada AA.** Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; **19:** 1870-1872 (IF = 5,993)

2. **Zasada AA,** Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Seroprevalence of diphtheria toxoid IgG antibodies in children, adolescents and adults in Poland. *BMC Infect. Dis.* 2013; **13:** 551 (IF = 3,025)
3. **Zasada A.A.** Występowanie i chorobotwórczość dla człowieka potencjalnie toksynotwórczych maczugowców – *Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans i Corynebacterium pseudotuberculosis. Post. Mikrobiol.* 2013; **52:** 201-209 (IF = 0,207)
4. **Zasada AA,** Rastawicki W, Śmietańska K, Rokosz N, Jagielski M. Comparison of seven commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of anti–diphtheria toxin antibodies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; **32:** 891-897 (IF = 3,024)
5. **Zasada AA**, Formińska K, Rzeczkowska M. Występowanie genów związanych z wytwarzaniem pili u szczepów *Corynebacterium diphtheriae. Med. Dośw. Mikrobiol.* 2012; **64:** 19-27
6. Farfour E, Badell E, **Zasada A**, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, Guiso N. Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. *J. Clin. Microbiol.* 2012; **50:** 173 (IF = 4,068)
7. **Zasada A.A.,** Baczewska-Rej M., Wardak S. Differentiation between invasive and non-invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2011; **6:** 717-720 (IF = 0,176)
8. **Zasada A.A.,** Jagielski M., Rzeczkowska M., Januszkiewicz A. Zastosowanie metody MLVA do genotypowania *Corynebacterium diphtheriae*. Badania wstępne. *Med. Dośw. Mikorbiol.* 2011; **63:** 209-218
9. **Zasada A.A.**, Baczewska-Rej M., Wardak S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; **14:** e907-e912 (IF = 2,529)
10. **Zasada A.A.,** Baczewska-Rej M. Typy szczepów *Corynebacterium diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004-2008. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2008; **60:** 183-190.

b) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac/pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

W swojej pracy badawczej po doktoracie zainteresowałam się pojawiającymi się w Polsce i na świecie poważnymi, obarczonymi wysoką śmiertelnością, inwazyjnymi zakażeniami

nietoksynotwórczymi szczepami *Corynebacterium diphtheriae*. Swoje badania prowadziłam wielokierunkowo. Celem jednego nurtu badań było poznanie właściwości genetycznych i fenotypowych nietoksynotwórczych *C. diphtheriae* izolowanych z zakażeń inwazyjnych w Polsce w latach 2004-2012 oraz próba powiązania ich ze zwiększonymi właściwościami patogennymi tych izolatów. Drugi kierunek badań stanowiła próba odpowiedzi na pytanie, kto jest szczególnie narażony na tego typu zakażenia. Celem trzeciego kierunku badań było zbadanie, czy w populacji polskiej występuje poziom przeciwciał przeciwbłoniczych, który zapewniałby ochronę przed zachorowaniami powodowanymi przez toksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae*.

C. diphtheriae wytwarzające toksynę błoniczą (toksynotwórcze) są dobrze znanym patogenem człowieka powodującymi miejscowe zakażenia układu oddechowego, oraz rzadziej, innych błon śluzowych, zwane błonicą, którego poważne powikłania w postaci wczesnego uszkodzenia włókien mięśnia sercowego, demielinizacji nerwów oraz zmian martwiczych, związane są z wytwarzaniem przez bakterie toksyny błoniczej. Szczepy nie wytwarzające toksyny błoniczej (nietoksynotwórcze) uznawane były do niedawna za niepatogenne. Błonica, niegdyś stanowiąca poważny problem zdrowia publicznego, została w znacznym stopniu opanowana dzięki wprowadzeniu w latach 40. dwudziestego wieku obowiązkowych szczepień przeciw tej chorobie. Jednakże stosowana na świecie szczepionka przeciwbłonicza zawiera tylko toksoid błoniczy wiec nie chroni przed zakażeniami szczepami nietoksynotwórczymi. Pojawiające się w ostatnich latach na świecie, również w Polsce, zakażenia nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae,* w tym zakażenia inwazyjne wskazują, że *C. diphtheriae* jest powracającym patogenem, a szczepienia mogły spowodować wyselekcjonowanie szczepów nie wytwarzających toksyny błoniczej, ale posiadających inne czynniki zjadliwości umożliwiające im rozprzestrzenianie się w populacji i wywoływanie zakażeń. Prawdopodobnie najbardziej spektakularny wzrost liczby zakażeń nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* odnotowano na terenie Anglii i Walii, gdzie w 1986 roku wyizolowano 8 szczepów nietoksynotwórczych i 1 toksynotwórczy, w kolejnych latach liczba nietoksynotwórczych izolatów zaczęła gwałtownie rosnąć i w roku 2000 osiągnęła 294, podczas gdy w tym samym roku wyizolowano tylko jeden szczep toksynotwórczy[1]. W kolejnych latach liczba izolatów nietoksynotwórczych na tym obszarze wahała się od 68 do 205 rocznie. Pojawienie się tego typu zakażeń odnotowano również m. in. we Francji, Włoszech, Szwajcarii, Niemczech, Kanadzie,

[1] Reacher M, Romsay M, White J i in. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae:* an emerging pathogen in England and Wales? Emerg. Infect. Dis. 2000; 6: 640-645.

Brazylii, a także Polsce[2,3]. Co więcej, większość tych zakażeń miała postać inwazyjną i obarczona była wysoką, sięgającą nawet 45% śmiertelnością. W Polsce pierwszy przypadek inwazyjnego zakażenia nietoksynotwórczym szczepem *C. diphtheriae* opisałam w 2004 roku. Od tego czasu zakażenia tego typu są odnotowywane co roku.

Ze względu na wzrastającą liczbę zakażeń nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae*, w tym poważnych zakażeń inwazyjnych, które wcześniej nie były odnotowywane w Polsce, postanowiłam zbadać pokrewieństwo genetyczne tych izolatów. Zakładałam, że genotypy izolatów pochodzących z zakażeń inwazyjnych będą się różnić od genotypów izolatów pochodzących z zakażeń miejscowych. W swoich badaniach zastosowałam metody stosowane wcześniej przez innych badaczy, takie jak rybotypowanie, PFGE, MLST, a także metody które do typowania *C. diphtheriae* zaadoptowałam po raz pierwszy, jak PCR MP, ERIC-PCR i MLVA. Pomimo zastosowania tak szerokiego wachlarza metod, nie udało mi się zróżnicować tych izolatów. Jedynie w profilach DNA uzyskanych metodą PCR MP zaobserwowałam występowanie dodatkowego prążka DNA u szczepów wyizolowanych z krwi. Jest to zaskakujące ponieważ badane szczepy wyizolowano na przestrzeni 9 lat od pacjentów zamieszkujących w różnych rejonach kraju, między którymi nie udało się ustalić żadnego powiązania epidemiologicznego.

W dalszych badaniach zaczęłam poszukiwać czynników, które mogłyby decydować o zwiększonych zdolnościach patogennych tych izolatów. Ze względu na to, że zwiększenie właściwości patogennych szczepów wielu gatunków bakterii związane jest z nabyciem plazmidów niosących geny kodujące czynniki zjadliwości – tzw. plazmidów wirulencji – swoje badania rozpoczęłam od sprawdzenia obecności plazmidów w komórkach nietoksynotwórczych szczepów *C. diphtheriae* wyizolowanych w latach 2004-2012. W kolejnym etapie przeprowadziłam badania występowania genów związanych z wytwarzaniem różnego typu pili przez szczepy *C. diphtheriae*. Pili u bakterii odpowiadają m.in. za przyleganie do różnych powierzchni i tkanek, a wnikanie bakterii do tkanek jest zwykle poprzedzone ich przyleganiem. Zbadałam obecność piętnastu genów związanych z wytwarzaniem trzech typów pili u szczepów *C. diphtheriae* izolowanych z zakażeń miejscowych i inwazyjnych w latach 2004-2012 i porównałam je z wynikami uzyskanymi dla szczepów izolowanych od nosicieli w latach 90. oraz szczepów izolowanych z przepadków błonicy w latach 90. i 60.

---

[2] Zasada AA, Baczewska-Rej M. Typy szczepów *Corynebacterium diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004-2008. Med. Dośw. Mikorbiol. 2008; 60: 183-190.
[3] Zasada AA. Nontoxigenic highly pathogenic clone of Corynebacterium diphtheriae, Poland, 2004-2012. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19: 1870-1872.

Zaczęłam się również zastanawiać dlaczego szczepy nierozróżnialne genetycznie u jednych pacjentów wywołują zakażenia inwazyjne, a u innych tylko miejscowe. Aby to zbadać przeanalizowałam wszystkie odnotowane w Polsce od 2004 roku przypadki zakażeń nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* uwzględniając wiek i płeć pacjentów, miejsce zamieszkania, rok wystąpienia objawów, choroby towarzyszące, sytuację socjoekonomiczną oraz używanie narkotyków i alkoholu.

Uwzględniając fakt, że szczepy nietoksynotwórcze *C. diphtheriae* mogą przekształcić się w toksynotwórcze po lizogenizacji fagiem β, a także ostatnie doniesienia o pojawiających się w innych krajach przypadkach błonicy powodowanej przez szczepy *C. ulcerans* wytwarzające toksynę błoniczą, których źródłem są koty domowe, postanowiłam zbadać, czy u osób należących do różnych grup wiekowych w polskiej populacji jest poziom przeciwciał przeciwbłoniczych zapewniający ochronę przed zachorowaniem.

Podsumowanie najważniejszych wyników:

1) Wykazałam, że bardzo prawdopodobnymi wrotami inwazyjnego zakażenia nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* jest próchnica zębów. Jest to pierwsza taka obserwacja na świecie (publikacja nr 1).

2) Stwierdziłam, że do opisywanych w piśmiennictwie czynników ryzyka inwazyjnego zakażenia *C. diphtheriae*, takich jak bezdomność, alkoholizm, cukrzyca, zażywanie narkotyków drogą dożylną, należy dodać marskość wątroby oraz próchnicę zębów (publikacja nr 1).

3) Wykazałam, że wszystkie zakażenia *C. diphtheriae* w Polsce w okresie ostatnich 9 lat są powodowane przez jeden klon (publikacje nr 1, 6 -10).

4) Opracowałam metodykę i wykazałam przydatność do genotypowania *C. diphtheriae* takich metod jak MLVA, PCR MP oraz ERIC-PCR, wcześniej nie stosowanych w badaniach tego drobnoustroju (publikacje nr 7 - 9). Opracowane przeze mnie metody mogą być z powodzeniem stosowane w większości laboratoriów badawczych i diagnostycznych ze względu na to, że nie wymagają wysoce specjalistycznej aparatury, a procedura ich wykonania nie jest skomplikowana ani czasochłonna.

5) Stwierdziłam brak genetycznego pokrewieństwa pomiędzy szczepami nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* izolowanymi z zakażeń w Polsce w latach 2004-

2012, a szczepami toksynotwórczymi i nietoksynotwórczymi izolowanymi w latach wcześniejszych oraz szczepami nietoksynotwórczymi izolowanymi z zakażeń inwazyjnych na terenie Francji w okresie ostatnich 23 lat (publikacje nr 6 – 9).

6) Wykazałam, że w leczeniu zakażeń *C. diphtheriae* w Polsce powinno unikać się stosowania cefotaksymu i penicyliny G, jeśli nie jest oznaczona antybiotykowrażliwość izolatu, ponieważ część szczepów izolowanych w Polsce ma obniżoną wrażliwość na ten antybiotyk (publikacje nr 6 i 9).

7) Stwierdziłam, że zwiększone właściwości inwazyjne nietoksynotwórczych szczepów *C. diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004-2012, nie są związane z nabyciem przez te szczepy plazmidów zjadliwości lecz z cechami kodowanymi chromosomalnie. Wśród nich z pewnością należy wymienić zdolnością do wytwarzania różnych typów pili, co bezpośrednio przekłada się na zdolność tych izolatów do przylegania do różnych typów tkanek (publikacje nr 5 i 9).

8) Oceniłam dostępne na europejskim rynku komercyjne testy ELISA do oznaczania przeciwciał przeciwbłoniczych IgG w surowicy i stwierdziłam ich ograniczoną przydatność. Zaproponowałam zwiększenie wiarygodności uzyskiwanych wyników (swoistości i specyficzności) poprzez stosowanie krzywej wzorcowej wyznaczonej w oparciu o międzynarodowy standard International Standard for Diphtheria Antitoxin 10/262 (publikacja nr 4).

9) Stwierdziłam niski poziom przeciwciał przeciwbłoniczych w populacji polskiej, szczególnie w grupie dzieci 0-2 lata oraz osób powyżej 40 roku życia. Zaproponowałam przeprowadzenie kampanii przypominającej lekarzom i pacjentom o konieczności podawania osobom dorosłym co 10 lat dawek przypominających szczepionki przeciwbłoniczej. Zaproponowałam również modyfikację kalendarza szczepień w sposób doprecyzowujący terminy podawania dawek przypominających u dorosłych np. w wieku lat 40, 50, 60, itp., co mogłoby ułatwić pacjentom i lekarzom monitorowanie tych szczepień. Zasugerowałam również przydatność przeprowadzenia badań immunogenności szczepionek DTP (błonica-tężec-krztusiec) stosowanych u dzieci w Polsce (publikacja nr 2).

<u>Omówienie publikacji stanowiących podstawę habilitacji.</u>

Publikacja: Zasada AA, Baczewska-Rej M: Typy szczepów *Corynebacterium diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004-2008. Med. Dośw. Mikrobiol. 2008; 60: 183-190.

Jest to druga praca dotycząca występowania zakażeń *C. diphtheriae* w Polsce, która ukazała się w ciągu minionych 11 lat, tj. od 1997 roku. W latach 90. na terenie Polski zakażenia *C. diphtheriae* odnotowywano w liczbie od zera do kilkunastu przypadków rocznie[4,5]. Były one powodowane przez szczepy toksynotwórcze i zwykle miały postać klasycznej błonicy z formowaniem pseudobłon martwiczych na błonach śluzowych gardła, nosa, uszu czy spojówkach oraz uogólnionym działaniem toksyny błoniczej, która wywołuje zmiany w mięśniu sercowym i układzie nerwowym. Ostatni odnotowanych na terenie kraju przypadek błonicy miał miejsce w 2000 roku.

W 2004 roku opisałam pierwszy w Polsce przypadek bakteriemii i zapalenia wsierdzia wywołanego przez szczep *C. diphtheriae* nie wytwarzający toksyny błoniczej (nietoksynotwórczy) u wcześniej zdrowego 38-letniego mężczyzny[6]. Dotychczas szczepy *C. diphtheriae* nie wytwarzające toksyny błoniczej uznawane były za niepatogenne.

Od 2004 roku przypadki zakażeń inwazyjnych i miejscowych nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* są odnotowywane w kraju każdego roku.

Przeprowadziłam identyfikację w oparciu o testy biochemiczne, wzrost na podłożach wybiórczo-różnicujących oraz morfologię kolonii i komórek bakteryjnych szczepów *C. diphtheriae* izolowanych w latach 2004-2008 z zakażeń ran oraz z zakażeń krwi. Określiłam biotypy badanych szczepów oraz zdolność do wytwarzania toksyny błoniczej. Następnie wykonałam typowanie genetyczne wszystkich badanych szczepów metodą elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym (PFGE).

Wszystkie badane szczepy wykazywały takie same właściwości biochemiczne, należały do biotypu *gravis* i nie wytwarzały toksyny błoniczej. Wszystkie, z wyjątkiem dwóch szczepów, były genetycznie nieodróżnialne przy zastosowaniu metody PFGE, a profile DNA pozostałych dwóch szczepów (jeden izolowany z krwi i jeden z wymazu z rany) różniły się zalewie jednym

---

[4] NIZP-PZH, Zakład Epidemiologii, GIS, Departament Przeciwepidemiczny. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. http://www.pzh.gov.pl/old-page/epimed/index_p.html

[5] Tomaszunas-Blaszczyk J, Galazka A. Why do adults contract diphtheria? Euro Surveill. 1997;2(8):pii=127. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=127

[6] Zasada AA, Zaleska M, Podlasin RB, Seferyńska I. The first case of septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobials 2005; 4:8.

prążkiem. Zgodnie z wytycznymi Tenovera i wsp.[7] dla interpretacji wyników PFGE, szczepy takie należy uznać za blisko spokrewnione a w przypadku zachorowań epidemicznych za przypuszczalnie należące do tego samego ogniska.

W przedstawionej pracy przeprowadziłam również analizę aktualnego piśmiennictwa międzynarodowego wskazując, że zakażenia nietoksynotwórczymi szczepami *C. diphtheriae* w Polsce nie są odosobnionymi przypadkami. Tego typu zakażenia opisano również w innych krajach Europy i Ameryki, jednakże w innych krajach obserwowano zróżnicowanie izolowanych szczepów zarówno pod względem genetycznym jak też biochemicznym (biotyp).

Ze względu na to, że praca ta miała na celu zwrócenie uwagi na problem pojawiających się nowych atypowych zakażeń *C. diphtheriae* w Polsce, została ona opublikowana w polskojęzycznym czasopiśmie, co miało pomóc w przekazaniu informacji o pojawiającym się problemie nowych zakażeń pracownikom laboratoriów diagnostycznych w Polsce, którzy nie zawsze mają możliwość śledzenia literatury anglojęzycznej.

Publikacje: Zasada AA, Baczewska-Rej M, Wardak S. Differentiation between invasive and non-invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates. Adv. Clin. Exp. Med. 2011; 20: 717-720.

Zasada AA, Baczewska-Rej M, Wardak S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. Int. J. Infect. Dis. 2010; 14: e907-e912.

Obserwowane różnice w przebiegu i ciężkości zachorowań będących skutkiem zakażenia nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* – od zakażeń miejscowych, jak stosunkowo łatwo wyleczalne zakażenia ran, po bakteriemie i zapalenie wsierdzia, obarczone 45% śmiertelnością – skłoniły mnie do poszukiwania innych metod genetycznego zróżnicowania tych szczepów, które umożliwiłyby rozróżnienie izolatów o potencjale inwazyjnym od izolatów wywołujących tylko miejscowe zakażenia. W tym celu zastosowałam, po odpowiedniej modyfikacji dla badanego gatunku, metody genotypowania drobnoustrojów, które dotychczas nie zostały zastosowane w genotypowaniu *C. diphtheriae*. Wśród nich znalazły się PCR Melting Profile (PCR MP) oraz ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR). Wybór metod nie był

[7] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV i in. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 2233-2239.

przypadkowy, bo techniki typowania bakterii typu fingerpritning oparte o PCR generalnie charakteryzują się najwyższym potencjałem różnicującym wśród opisanych metod typowania genetycznego[8].

Do grupy badanych szczepów włączyłam nie tylko izolaty nietoksynotwórcze pochodzące z zakażeń miejscowych oraz uogólnionych, wyizolowane w latach 2004-2008, ale także szczepy toksynotwórcze wyizolowane z przypadków błonicy w latach 60. i 90. oraz szczepy nietoksynotwórcze wyizolowane od nosicieli w latach 90. Umożliwiło to nie tylko walidację zastosowanych po raz pierwszy metod genotypowania, ale także dało obraz zróżnicowania izolatów pochodzących z różnych lat i z różnych typów zakażeń. Wyniki uzyskane metodą PCR MP oraz ERIC-PCR porównałam z wynikami uzyskanymi metodą PFGE, która uznawana jest za „złoty standard" w genotypowaniu większości drobnoustrojów oraz z wynikami uzyskanymi metodą rybotypowania, która z kolei uznawana jest za „złoty standard" w genotypowaniu *C. diphtheriae*.

Podobieństwo wszystkich badanych szczepów (toksynotwórczych i nietoksynotwórczych) oceniłam na 52,3% w metodzie PCR MP oraz 65% w metodach ERIC-PCR i PFGE. Metodę PCR MP charakteryzowała nieco większa siła różnicująca w porównaniu do pozostałych metod. Co ciekawe, zarówno przy zastosowaniu metody PFGE, rybotypowania, jak też ERIC-PCR, nie udało się zróżnicować szczepów nietoksynotwórczych izolowanych w latach 2004-2008. Jednak w profilach DNA uzyskanych metodą PCR MP zauważyłam dodatkowy prążek DNA w czterech z pięciu szczepów wyizolowanych z krwi. Poczyniona przeze mnie obserwacja różnic w genomie pomiędzy szczepami *C. diphtheriae* izolowanymi z zakażeń inwazyjnych a szczepami izolowanymi z zakażeń miejscowych jest pierwszą taką odnotowaną w światowym piśmiennictwie. Obecność dodatkowego prążka DNA może wskazywać na występowanie w tych szczepach mutacji, która może być związana z ich zdolnościami inwazyjnymi. Zwiększenie zdolności patogennych drobnoustrojów często wiąże się z nabyciem genów zjadliwości zlokalizowanych w wyspach patogenności czy profagach. Jednak nie są to jedyne mechanizmy zwiększające chorobotwórczość bakterii. Zjadliwość wielu patogenów bakteryjnych związana jest z obecnością w ich komórkach plazmidów wirulencji. Dlatego postanowiłam zbadać obecność plazmidów w badanych szczepach *C. diphtheriae* stosując dwie metody ich izolacji: lizę alkaliczną oraz komercyjny zestaw do izolacji plazmidów z zastosowaniem kolumienek ze złożem krzemionkowym. Nie wykryłam obecności plazmidów w żadnym z badanych szczepów,

[8] van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L i in. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2007; 13(Suppl. 3): 1-46.

co wskazuje, że cechy nadające *C. diphtheriae* zdolności inwazyjne są kodowane chromosomalnie.

Mając na uwadze wysoką śmiertelność w zakażeniach inwazyjnych *C. diphtheriae* i związaną z tym konieczność szybkiego zastosowania właściwej terapii antybiotykowej, postanowiłam zbadać wrażliwość na antybiotyki badanych izolatów określając dla każdego z nich wartości MIC (minimum inhibitory concentrations) 14 antybiotyków. Wszystkie badane izolaty były wrażliwe na penicylinę, erytromycynę, imipenem, wankomycynę, daptomycynę, gentamycynę, tetracyklinę, klindamycynę, trimetoprim/sulfametoksazol, ryfampicynę, chinuprystynę/dalfoprystynę i linezolid. Natomiast 27% badanych izolatów była średniowrażliwa na cefotaksym, co wskazuje, że antybiotyk ten nie powinien być stosowany w terapii jeśli nie wykonano antybiogramu, który potwierdziłby wrażliwość izolatu na ten lek.

Wykonane przeze mnie badania pokazały przydatność metod PCR MP i ERIC-PCR do różnicowania izolatów *C. diphtheriae*. Atutem tych metod jest prostota ich procedury, szybkość wykonania oraz niskie koszty badania. Jednocześnie wykazałam istnienie różnic w genomach blisko spokrewnionych izolatów nietoksynotwórczych *C. diphtheriae* pochodzących z różnych typów zakażeń, tj. miejscowych zakażeń ran oraz inwazyjnych zakażeń krwi i wsierdzia. Różnice te mogą mieć związek z właściwościami patogennymi tych izolatów i wymagają dalszych badań. Ponadto, stosując kilka metod genotypowania wykazałam, że szczepy nietoksynotwórcze izolowane w latach 2004-2008 nie są spokrewnione ze szczepami toksynotwórczymi i nietoksynotwórczymi izolowanymi w latach wcześniejszych na terenie Polski.

Publikacja: Zasada AA, Jagielski M, Rzeczkowska M, Januszkiewicz A. Zastosowanie metody MLVA do genotypowania *Corynebacterium diphtheriae*. Badania wstępne. Med. Dośw. Mikrobiol. 2011; 63: 209-218.

Potrzeba zróżnicowania nietoksynotwórczych szczepów *C. diphtheriae* izolowanych z zakażeń inwazyjnych od tych pochodzących z zakażeń miejscowych skłoniła mnie do podjęcia próby zastosowania metody MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) do genotypowania tego drobnoustroju. Jest to stosunkowo nowa metoda, która została z powodzeniem zastosowana do różnicowania drobnoustrojów charakteryzujących się dużą stabilnością genomu i tym samym bardzo ograniczoną zmiennością genetyczną, takich jak *Bacillus anthracis, Yersinia pestis* czy *Francisella tularensis*. Metoda ta opiera się na zmianach

zachodzących w sekwencji powtórzeń nukleotydowych, które podlegają dużej zmienności na skutek ślizgania się polimerazy lub rekombinacji, czego skutkiem są zmiany w długości fragmentów DNA zawierających powtórzenia. Mechanizm ten jest również wykorzystywany przez wiele mikroorganizmów do szybkiej zmienności fenotypowej, jak na przykład różne mechanizmy regulacji ekspresji genów, czy zmiany w powstającym transkrypcie na skutek przesunięcia ramki odczytu. Przykładem może tu być regulacja ekspresji genów biosyntezy lipooligosacharydu u *Haemophilus influenzae*[9]. VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) występują często również w genach wirulencji, jak np. geny kodujące hemolizyny, co może mieć bezpośredni wpływ na zjadliwość szczepów oraz ich zmienność ewolucyjną[10].

W celu doboru odpowiednich do genotypowania *C. diphtheriae* markerów VNTR przeanalizowałam sekwencję całego genomu szczepu *C. diphtheriae* NCTC 13129, która jest dostępna w GenBank pod numerem BX248353. W sumie zidentyfikowałam 75 fragmentów zawierających tandemowe powtórzenia. Do dalszych badań wybrałam 14 z nich, kierując się m.in. długością pojedynczego powtórzenia, aby możliwe było zaobserwowanie zróżnicowania wielkości amplifikowanych fragmentów DNA w elektroforezie w żelu agarozowym. Następnie zaprojektowałam oligonukleotydy starterowe do amplifikacji tych fragmentów metodą PCR, w taki sposób, aby amplifikacja wszystkich markerów przebiegała w takich samych warunkach. Po przeprowadzeniu amplifikacji wyselekcjonowanych markerów VNTR z DNA kolekcji szczepów obejmującej toksynotwórcze i nietoksynotwórcze izolaty pochodzące z zakażeń inwazyjnych, miejscowych, od nosicieli oraz z przypadków błonicy, stwierdziłam potencjalną przydatność do genotypowania 8 markerów, ponieważ pozostałych sześciu nie wykrywałam we wszystkich badanych szczepach lub występowały one w genomie w kilku różnych kopiach. Użyteczne markery oznaczyłam jako v3, v6, v7, v8, v9, v10, v12, v13. Dla markerów v3, v8 i v13 nie zaobserwowałam różnic wielkości w badanej grupie szczepów. Natomiast stwierdziłam 2 allele markera v6, pięć alleli markera v7, cztery allele markera v9, sześć alleli markera v10 i pięć alleli markera v12 w badanej grupie 28 szczepów. Obliczyłam Indeks Simpsona (D), który określa siłę różnicującą, dla każdego markera indywidualnie oraz dla całej metody. Indeks dla pojedynczych markerów wyniósł od 0 do 0,756. Największym stopniem różnicowania charakteryzowały się markery v10 – 0,746 i v7 – 0,735. Indeks Simpsona dla całej metody wyniósł 0,87. Wśród badanych szczepów zidentyfikowałam 12 genotypów MLVA. Szczepy nietoksynotwórcze *C. diphtheriae* izolowane w latach 2004-2008 należały do dwóch blisko

[9] Zasada AA. Molekularna charakterystyka czynników wirulencji *Haemophilus influenzae*. Post. Mikrobiol. 42: 23-38.
[10] van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007; 49: 22-27.

spokrewnionych genotypów różniących się jedynie w obrębie jednego markera v9. Jednakże różnica ta nie pozwalała na rozróżnienie szczepów inwazyjnych i izolowanych z zakażeń miejscowych. Co więcej, według zalecanej przez Noller i wsp.[11] interpretacji wyników MLVA wszystkie te szczepy należy traktować jako pochodzące z tego samego źródła.

Opracowana przez mnie metoda MLVA do genotypowania *C. diphtheriae* w badaniach wstępnych okazała się przydatna do różnicowania tego drobnoustroju. Posiada ona szereg zalet, takich jak fakt, że różnice wielkości pomiędzy allelami poszczególnych markerów są na tyle duże, że możliwe jest ich stwierdzenie w elektroforezie agarozowej, co czyni tę metodę dostępną dla laboratoriów nie posiadających wyspecjalizowanej aparatury badawczej. W metodzie MLVA amplifikowane są konkretne loci, co oznacza, że w przeciwieństwie do większości innych metod genotypowania, analizowany fragment DNA jest znany. Pozwala to uniknąć problemów, jakie pojawiają się na przykład przy zastosowaniu metody PFGE, gdzie uzyskuje się obraz fragmentów DNA o nieznanej sekwencji nukleotydowej, co może prowadzić do sytuacji błędnego uznania szczepów za identyczne lub spokrewnione na podstawie profili zawierających fragmenty DNA o identycznej długości, ale które mogą zwierać zupełnie różne sekwencje nukleotydowe. Zaprojektowanie wysoce swoistych starterów do amplifikacji markerów MLVA pozwala na uniknięcie takich błędów. Ponadto wynik uzyskany metodą MLVA może zostać potwierdzony przez sekwencjonowanie. Ze względu na to, że wynik MLVA ma postać liczbową możliwe jest utworzenie internetowej bazy danych, która ułatwi porównywanie wyników uzyskanych w różnych laboratoriach na świecie, bez ryzyka błędnej interpretacji wynikającej np. z zastosowania różnej aparatury lub różnych warunków reakcji. Jednakże dla pełnej oceny przydatności i wiarygodności tej metody konieczne jest jej sprawdzenie na znacznie większej liczbie szczepów.

Publikacja: Farfour E, Badell E, Zasada A, Hotzel H, Tomaso H, Guillot S, Guiso N. Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. J. Clin. Microbiol. 2012; 50: 173.

Problemem zakażeń inwazyjnych powodowanych przez nietoksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae* udało mi się zainteresować grupy badaczy z Instytutu Pasteura w Paryżu oraz

[11] Noller AC, McEllistrem MC, Shutt KA i in. Locus-specific mutational events in a multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Micorbiol. 2006; 44: 374-377.

Instytutu Loefflera w Jenie, z którymi prowadziłam współpracę w zakresie innych tematów badawczych. Niniejsza publikacja jest pierwszym efektem tego zainteresowania.

Przeprowadziliśmy badania retrospektywne podobieństwa na poziomie genetycznym i fenotypowym inwazyjnych szczepów *C. diphtheriae* wyizolowanych z przypadków bakteriemii na terenie Francji (w tym Nowej Kaledonii) oraz Polski w latach 1987-2010. Identyfikację gatunku oraz ocenę potencjalnej zdolności wytwarzania toksyny błoniczej przeprowadziliśmy metodami biologii molekularnej z zastosowaniem techniki PCR. Biotyp każdego z badanych szczepów określiliśmy badając odpowiednie reakcje biochemiczne. W oparciu o opracowaną w ostatnim czasie metodę MLST (Multilocus Sequence Typing) do genotypowania *C. diphtheriae* i utworzoną bazę danych genotypów występujących na świecie[12] określiliśmy genotyp MLST każdego z badanych izolatów, co pozwoliło nam poznać rozprzestrzenianie się inwazyjnych *C. diphtheriae* oraz pokrewieństwo pomiędzy szczepami izolowanymi w różnych rejonach wywołującymi atypowe zakażenia inwazyjne. Ponadto, pojawiające się doniesienia o wielolekooporności izolatów *C. diphtheriae*[13] skłoniły nas do oznaczenia wrażliwości badanych szczepów na 11 antybiotyków metodą krążkową oraz MIC.

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że wszystkie badane izolaty pochodzące z zakażeń inwazyjnych (bakteriemia) nie posiadały zdolności wytwarzania toksyny błoniczej, co potwierdza moją hipotezę, iż szczepy te nabyły dodatkowe czynniki zjadliwości inne niż toksyna, która do niedawna była uznawana za główny czynnik zjadliwości tego drobnoustroju, a szczepy jej nie wytwarzające za niepatogenne. Z wyjątkiem jednego izolatu należącego do biotypu *belfanti*, pozostałe szczepy należały do biotypów *mitis* i *gravis* w porównywalnym odsetku, z tym że wszystkie szczepy wyizolowane na terenie Polski oraz Nowej Kaledonii należały do biotypu *gravis*, a wśród szczepów wyizolowanych na terenie Francji kontynentalnej wszystkie za wyjątkiem trzech (dwa biotyp *gravis* i jeden wyżej wspomniany biotyp *belfanti*) należały do biotypu *mitis*. Zaobserwowaliśmy również wyraźną dominację jednego genotypu MLST na każdym z badanych terytoriów. Wszystkie szczepy izolowane w Polsce z zakażeń inwazyjnych należały do genotypu ST8. Wszystkie szczepy wyizolowane w Nowej Kaledonii, z wyjątkiem jednego, należały do genotypu ST82. Natomiast 17 z 24 szczepów wyizolowanych z zakażeń inwazyjnych na terenie Francji kontynentalnej reprezentowało genotyp ST130. Każdy z pozostałych izolatów z tego rejonu reprezentował inny genotyp MLST.

---

[12] Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, i in. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Clin. Microbiol. 2010; 48: 4177-4185.

[13] Mina NV, Burdz T, Wiebe D, i in. Canada's first case of a multidrug-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain, isolated from a skin abscess. J. Clin. Microbiol. 2011; 49: 4003–4005.

Dominujący na danym terenie genotyp mógł wywoływać zakażenia inwazyjne w ograniczonym okresie czasu, jak to miało miejsce na terenie Francji kontynentalnej, gdzie w latach 1991-1993 wszystkie odnotowane zakażenia inwazyjne *C. diphtheriae* były powodowane przez genotyp ST130, lub przez długi okres czasu, jak to ma miejsce w Polsce od 2004 roku do chwili obecnej, gdzie wszystkie inwazyjne izolaty *C. diphtheriae* należą do genotypu ST8. Stwierdziliśmy również, że niektóre z genotypów, np. ST8 i ST39 prawdopodobnie mają zdolność rozprzestrzeniania się ponieważ były izolowane w odległych regionach geograficznych. Należy także mieć na uwadze, że izolaty powodujące bakteriemię mogą również wywoływać zakażenia miejscowe w tym błonicę, bo niektóre z genotypów np. ST8 były również izolowane z przypadków błonicy[6].

Przeprowadzone przez nas badania wrażliwości na antybiotyki inwazyjnych izolatów *C. diphtheriae* pokazały, że wszystkie one były wrażliwe na erytromycynę – jeden z antybiotyków zalecanych w leczeniu zakażeń *C. diphtheriae* – ale 6 izolatów z Polski było średniowrażliwych na penicylinę G – drugi z zalecanych antybiotyków. Ponadto 9 szczepów izolowanych we Francji było opornych na rifampicynę oraz jeden na tetracyklinę. Żaden z badanych izolatów nie był wielolekooporny. Nie zaobserwowaliśmy korelacji pomiędzy genotypem a opornością na antybiotyki.

Publikacja: Zasada AA, Formińska K, Rzeczkowska M. Występowanie genów związanych z wytwarzaniem pili u szczepów *Corynebacterium diphtheriae*. Med. Dośw. Mikrobiol. 2012; 64: 19-27.

Przyleganie bakterii patogennych do komórek gospodarza jest kluczowym etapem w powstawaniu zakażenia. Proces ten zachodzi na pośrednictwem obecnych na powierzchni komórki bakteryjnej białek adhezyjnych. Obecność określonych czynników adhezyjnych na powierzchni komórki bakteryjnej determinuje tropizm patogenu do typu tkanek wytwarzających na swojej powierzchni określone receptory. Adhezja bakterii do tkanek zachodzi głównie przy udziale filamentowych struktur zwanych pili, które są uznawane za ważny czynnik zjadliwości w przypadku wielu zakażeń, jak np. w zakażeniach układu moczowego, płciowego, oddechowego czy pokarmowego. Jednak przyleganie to nie jedyna funkcja pili. Organelle te są często receptorami dla bakteriofagów, biorą udział w transferze DNA, tworzeniu biofilmu, agregacji komórek, wnikaniu do komórek gospodarza, ruchu.

Dotychczas u *C. diphtheriae* opisano 3 typy pili określone jako pili typu SpaA, SpaD i SpaH. W badaniach prowadzonych na hodowlach tkankowych HEp-2 zaobserwowano trzy formy przylegania tych drobnoustrojów: agregacyjną, zlokalizowaną i dyfuzyjną[14]. W swoich badaniach podjęłam próbę odpowiedzi na pytanie, czy istnieje korelacja pomiędzy rodzajem zakażenia wywoływanym przez dany szczep *C. diphtheriae* a jego zdolnością do wytwarzania określonego typu pili determinowaną obecnością odpowiednich genów. Do badań wybrałam grupę szczepów obejmującą izolaty nietoksynotwórcze pochodzące z zakażeń krwi, z zakażeń ran i od bezobjawowych nosicieli oraz szczepy toksynotwórcze izolowane z przypadków błonicy. Zdecydowałam się zbadać obecność zarówno genów kodujących białka strukturalne pili, jak też genów kodujących sortazy decydujące o składaniu pili – w sumie 15 genów, które wybrałam po przeprowadzeniu analizy sekwencji nukleotydowej całego genomu szczepu NCTC 13129 dostępnego w GenBank pod numerem BX248353. Były to geny *spaA, spaB, spaC* kodujące białka pili typu SpaA, geny *spaD, spaE, spaF* kodujące białka pili typu SpaD, geny *spaH, spaG, spaI* kodujące białka pili typu SpaH oraz geny kodujące sortazy oznaczone od *srtA* do *srtF*. Następnie zaprojektowałam odpowiednie oligonukleotydy starterowe do wykrywania obecności wyżej wymienionych genów techniką PCR.

Stwierdziłam dużą mozaikowość w składzie genów związanych z wytwarzaniem pili u *C. diphtheriae*. Może to być związane z faktem, że wszystkie geny pili zlokalizowane są na wyspach patogenności, co sugeruje, że mogą być nabywane i tracone przez różne szczepy. Wyniki moje potwierdzają, że obserwowana heterogenność we właściwościach patogennych, ujawniająca się w zdolności do wywoływania diametralnie różnych zakażeń, ma odzwierciedlenie w heterogenności genomu. Obecność wszystkich badanych genów pili stwierdziłam tylko u wszystkich szczepów nietoksynotwórczych izolowanych z krwi i zakażeń ran w latach 2004-2010. Pełen zestaw genów pili może wiązać się z potencjałem inwazyjnym tych szczepów, bo jak wykazały badania Mandlik i wsp.[15] różne typy pili mają różną wydajność przylegania do poszczególnych typów tkanek. Posiadanie przez szczep *C. diphtheriae* zdolności do wytwarzania całej gamy pili pozwala mu na przyleganie do szerokiego wachlarza tkanek, co zwiększa możliwości rozprzestrzeniania się tego drobnoustroju w organizmie człowieka. Dla porównania u nietoksynotwórczych szczepów wyizolowanych od nosicieli stwierdziłam brak genów *spaA* i *spaB*. Również u wszystkich szczepów toksynotwórczych izolowanych z przypadków błonicy nie było pełnego zestawu genów pili. U większości z nich stwierdziłam

[14] Hirata R Jr, Souza SMS, Rocha de Souza CM i in. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains. Microbial. Path. 2004; 36: 125-130.
[15] Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. Corynebacterium diphtheriae employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. Mol. Microbiol. 2007; 64: 111-124.

brak genu *spaA,* a także genów *spaH* i *spaG*. W dwóch szczepach toksynotwórczych nie wykryłam całej grupy genów związanych z wytwarzaniem pili typu SpaD, co może sugerować brak całej wyspy patogenności niosącej te geny. Natomiast w obrębie wyspy patogenności kodującej pili typu SpaH zaobserwowałam ogromną mozaikowość w składzie genów.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach nie stwierdziłam korelacji pomiędzy występowaniem określonych typów pili a biotypem szczepu. Natomiast potwierdziłam obserwowaną przez innych badaczy mozaikowość genomu *C. diphtheriae*. Wykazałam również możliwość istnienia zależności pomiędzy zjadliwością szczepu a wytwarzanymi przez niego czynnikami adhezyjnymi. Wydaje się, że do wywoływania zakażeń inwazyjnych przez nietoksynotwórcze *C. diphtheriae* jest konieczna zdolność wytwarzania wszystkich typów pili. Natomiast pełen garnitur genów związanych z wytwarzaniem pili nie jest niezbędny do wywoływania błonicy.

Publikacja: Zasada AA. Występowanie i chorobotwórczość dla człowieka potencjalnie toksynotwórczych maczugowców – *Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans* i *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Post. Mikrobiol. 2013; 52: 201-209.

Moje zainteresowanie czynnikami zjadliwości oraz zakażeniami powodowanymi przez *C. diphtheriae* zaowocowało analizą obecnego stanu wiedzy w tym zakresie i powstaniem pracy przeglądowej, w której przedstawiłam dotychczas poznane czynniki zjadliwości oraz chorobotwórczość nie tylko *C. diphtheriae*, ale także blisko spokrewnionych gatunków – *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* – które również mogą wytwarzać toksynę błoniczą.

Pracę rozpoczęłam od przedstawienia charakterystyki rodzaju *Corynebacterium*, cech wykorzystywanych do identyfikacji i różnicowania *C. diphtheriae, C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* oraz charakterystyki czterech biotypów *C. diphtheriae*. Następnie omówiłam występowanie tych czterech gatunków maczugowców w środowisku z uwzględnieniem ich patogenności dla zwierząt. Zwróciłam tu uwagę na ostatnio pojawiające się w literaturze doniesienia o koniach, kotach i psach będących źródłem zakażenia *C. diphtheriae*, pomimo że dotychczas uważano, iż drobnoustrój ten nie jest patogenem odzwierzęcym.

Szczegółowo omówiłam zakażenia człowieka tymi trzema gatunkami drobnoustrojów na przestrzeni ostatnich 25 lat. Zwróciłam uwagę na obserwowany w ostatnim czasie w wielu

krajach znaczący wzrost liczby zakażeń inwazyjnych o bardzo wysokiej śmiertelności, powodowanych przez nietoksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae*, wcześniej uznawane za niepatogenne, a także na pojawianie się zakażeń toksynotwórczymi *C. ulcerans*.

W kolejnej części swojej pracy przedstawiłam znane obecnie czynniki zjadliwości tych trzech gatunków maczugowców. Bardzo szczegółowo omówiłam najlepiej poznany czynnik, jakim jest toksyna błonicza, uwzględniając mechanizm lizogenizacji *Corynebacterium* bakteriofagiem β niosącym geny toksyny błoniczej, mechanizm regulacji ekspresji tych genów w odpowiedzi na stężenie jonów żelaza, budowę cząsteczki toksyny błoniczej oraz mechanizm intoksykacji i w konsekwencji apoptozy komórki eukariotycznej. Tę część pracy wzbogaciłam rycinami przedstawiającymi schematycznie regulację ekspresji toksyny błoniczej oraz model działania toksyny błoniczej. Dalej omówiłam czynniki adhezji, w tym różnego typu pili, białka powierzchniowe nie tworzące struktur pili oraz inne związki jak np. polisacharydy biorące udział w przyleganiu. Kolejnym zagadnieniem, jakie poruszyłam były mechanizmy pozyskiwania żelaza. Żelazo jest jednym z kluczowych składników niezbędnych do wzrostu większości bakterii, a w organizmie człowieka i zwierząt występuje w postaci związanej z białkami lub w postaci kompleksów. Dlatego drobnoustroje patogenne, a więc także *C. diphtheriae, C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*, rozwinęły systemy pozyskiwania żelaza z tkanek gospodarza, takie jak wytwarzanie sideroforów, czy systemy pozyskiwania żelaza z hemu i heminy.

W dalszej części pracy omówiłam mniej zbadane czynniki zjadliwości, jakimi są fosfolipaza D – enzym degradujący sfingomielinę, uznawany za główny czynnik wirulencji *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis,* proteazy serynowe – wpływające na modulację swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza oraz destrukcję tkanek gospodarza, oraz neuraminidazę H – enzym wytwarzany przez wszystkie trzy omawiane gatunki drobnoustrojów, modyfikujący zdolności komórek gospodarza do odpowiedzi na zakażenie bakteryjne.

Publikacje: Zasada AA, Rastawicki W, Śmietańska K, Rokosz N, Jagielski M. Comparison of seven commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of anti-diphtheria toxin antibodies. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2013; 32: 891-897.

Zasada AA, Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M. Seroprevalence of diphtheriae toxoid IgG antibodies in children, adolescents and adults in Poland. BMC Infect. Dis. 2013; 13: 551.

Fakt występowania nietoksynotwórczych *C. diphtheriae* w populacji polskiej, które mogą się przekształcić w szczepy toksynotwórcze poprzez lizogenizację bakteriofagiem β, jak również pojawiające się w innych krajach zakażenia toksynotwórczymi *C. ulcerans*, których źródłem są najczęściej koty domowe, skłoniły mnie do zbadania czy w populacji polskiej utrzymywany jest ochronny poziom przeciwciał przeciw toksynie błoniczej. W pierwszym etapie tych badań w celu doboru właściwego testu do oznaczania poziomu przeciwciał IgG przeciw toksynie błoniczej postanowiłam przeprowadzić porównanie siedmiu dostępnych na polskim i europejskim rynku komercyjnych zestawów ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) następujących producentów: Mikrogen, Immunolab, Sekisui Virotech, NovaTec Immunodiagnostica, Institut Virion/Serion, IBL International oraz Euroimmun. W przeprowadzonych badaniach wykazałam znaczące różnice w wynikach badań tej samej grupy surowic zależne od użytego testu. Dla przykładu liczba próbek, w których oznaczony poziom przeciwciał przeciwbłoniczych był poniżej poziomu ochronnego (<0,1 IU/ml) wahała się od prawie 28% w testach Mikrogen do 0 w testach Sekisui Virotech. Dużą rozbieżność wyników zaobserwowałam gdy poziom przeciwciał w badanych próbkach był obliczany na podstawie krzywej wzorcowej skonstruowanej w oparciu o wzorce załączone do zestawów przez producentów testów. Rozbieżności były mniejsze, gdy poziom przeciwciał był obliczany na podstawie krzywej skonstruowanej w oparciu o nowy międzynarodowy wzorzec – International Standard for Diphtheria Antitoxin 10/262. W swoich badaniach wyliczyłam również względną swoistość i specyficzność każdego z badanych zestawów testów. Określiłam również średnią, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności dla każdego testu w odniesieniu do próbek o niskim, średnim i wysokim poziomie przeciwciał przeciwbłoniczych.

Na podstawie powyższych badań do przeprowadzenia oceny poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych IgG w populacji polskiej wybrałam zestaw firmy Euroimmun. Poziom przeciwciał zbadałam w 1387 próbkach surowicy pochodzących od osób mieszkających w różnych regionach Polski w wieku od 1 miesiąca do 85 lat. Stwierdziłam brak ochronnego poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych (<0,1 IU/ml) u prawie 40% badanych, u prawie 55% wykryłam poziom zapewniający ochronę podstawową (0,1-1,0 IU/ml) i będący wskazaniem do podania niezwłocznie dawki przypominającej szczepionki przeciwbłoniczej, a zaledwie 5% badanych miało poziom przeciwciał przeciwbłoniczych zapewniający długotrwałą ochronę (>1,0 IU/ml). Tak niski poziom przeciwciał przeciwbłoniczych jest zaskakujący, bo zgodnie z danymi opublikowanymi przez Światową Organizację Zdrowia ponad 99% dzieci w Polsce otrzymuje co najmniej trzy dawki podstawowego szczepienia DTP (błonica-tężec-krztusiec). Moje badania

pokazały, że 13% dzieci w wieku 0-2 lata ma poziom przeciwciał przeciwbłoniczych >1,0 IU/ml. Odsetek ten rośnie z każdą dawką przypominającą szczepienia podawaną w wieku 6, 14 i 19 lat i jest największy w grupie osób w wieku 19-25 lat. Następnie zaczyna drastycznie spadać i u osób w wieku >40 roku życia poziom przeciwciał >1,0 IU/ml nie jest wykrywany. Uzyskane przeze mnie wyniki są bardzo niepokojące, bo zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia, aby zapewnić odporność populacji na błonicę konieczne jest uzyskanie ochronnego poziomu przeciwciał u co najmniej 90% dzieci i 75% dorosłych. Wśród krajów europejskich, równie niski jak w Polsce poziom przeciwciał przeciwbłoniczych u dzieci był odnotowany jedynie w Czechach[16]. We wszystkich pozostałych krajach, w których przeprowadzono podobne badania odsetek dzieci z ochronnym poziomem przeciwciał przeciwbłoniczych przekraczał 90%. W tej sytuacji wydaje się wskazane przeprowadzenie badań dotyczących immunogenności stosowanej w Polsce szczepionki przeciwbłoniczej. Polska jest obecnie jedynym krajem, w którym wciąż stosuje się u dzieci szczepionkę DTP zawierającą pełnokomórkowy komponent krztuścowy (DTwP). Na polskim rynku dostępna jest również bezkomórkowa szczepionka rekombinowana (DTaP), jednakże nie jest ona refundowana. Pozwala to przypuszczać, że większość dzieci immunizowana jest szczepionką DTwP. W naukowym piśmiennictwie międzynarodowym istnieją doniesienia, że produkcja przeciwciał w odpowiedzi na szczepienia szczepionką DTwP jest niższa dla wszystkich zawartych w szczepionce antygenów w porównaniu do szczepienia szczepionką DTaP[17,18] . Jednak są również prace mówiące o tym, że immunogenność komponentu błoniczego w szczepionce DTwP oraz DTaP jest porównywalna[19]. Niestety, nie miałam dostępu do danych, którą szczepionką szczepione były dzieci z mojej grupy badanej.

W większości krajów, w których zbadano poziom przeciwciał przeciwbłoniczych, obserwowano – podobnie jak w moich badaniach – znaczny spadek liczby osób z ochronnym poziomem przeciwciał w grupie wiekowej powyżej 40 lat. Jedynie w krajach endemicznych błonicy, gdzie wciąż występują zachorowania na tę chorobę, liczba przeciwciał u osób dorosłych utrzymywała się na wysokim poziomie, jak ma to miejsce na przykład na Łotwie.

---

[16] Di Giovane P, Kafatos G, Nardone A, i in. Comparative seroepidemiology of diphtheria in six European countries and Israel. Epidemiol. Infect. 2013; 141: 132-142.

[17] Patel SS, Wagstaff AJ. A cellular pertussis vaccine (Infanrix-DTPa; SB-3). A review of its immunogenicity, protective efficacy and tolerability in the prevention of *Bordetella pertussis* infection. Drugs 1996; 52: 254-275.

[18] Matheson AJ, Goa KL. Diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine absorbed (Triacelluvax; DTaP3-CB): a review of its use in the prevention of *Bordetella pertussis* infection. Paediatr. Drugs 2000; 2: 139-159.

[19] Pichichero ME, Deloria MA, Rennels MB i in. A safety and immunogenicity comparison of 12 acellular pertussis vaccines and one whole-cell pertussis vaccine given as a fourth dose in 15- and 20-month-old children. Pediatrics 1997; 100: 722-288.

Wyniki moich badań w połączeniu z odnotowanymi w innych krajach przypadkami zachorowań na błonicę, gdzie źródłem zakażenia były koty domowe, pokazują konieczność przeprowadzenia kampanii przypominającej pacjentom i lekarzom o konieczności podawania osobom dorosłym dawek przypominających szczepionki przeciwbłoniczej co 10 lat, zgodnie z obowiązującymi w Polsce zaleceniami. Szczególną uwagę należy zwrócić na zaszczepienie osób opiekujących się kotami oraz osób podróżujących do rejonów endemicznych błonicy. Być może sytuację doszczepiania dorosłych poprawiłaby modyfikacja kalendarza szczepień w sposób doprecyzowujący terminy podawania dawek przypominających u dorosłych np. w wieku lat 40, 50, 60, itp., co mogłoby ułatwić pacjentom i lekarzom monitorowanie tych szczepień.

Publikacja: Zasada AA. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004-2012. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19: 1870-1872.

W pracy podjęłam się dokonania analizy 25 przypadków zakażeń nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae*, które miały miejsce w Polsce w latach 2004-2012. Osiemnaście z nich stanowiło zakażenia inwazyjne, a siedem było zakażeniami miejscowymi. W badaniach wzięłam pod uwagę zarówno cechy wyizolowanych szczepów, jak też cechy pacjentów mogące potencjalnie stanowić czynniki predysponujące takiego zakażenia. Uzyskane wyniki porównałam z danymi opublikowanymi w innych krajach Europy, w których również odnotowano w ostatnim czasie zakażenia nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae.*

Wszystkie wyizolowane w tym okresie z zakażeń szczepy *C. diphtheriae* nie wytwarzały toksyny błoniczej, należały do biotypu *gravis* (za wyjątkiem jednego szczepu biotypu *mitis* pochodzącego z zakażenia miejscowego), wszystkie stanowiły jeden genotyp (za wyjątkiem wspomnianego szczepu *mitis*) w metodach PFGE, MLST oraz w rybotypowaniu. Natomiast wyizolowane zostały w różnym czasie, tj. na przestrzeni 9 lat, od pacjentów mieszkających w różnych rejonach kraju.

Stwierdziłam, że wszystkie przypadki inwazyjnych zakażeń *C. diphtheriae*, za wyjątkiem jednego, wystąpiły u mężczyzn w wieku od 17 do 71 lat, przy czym grupą najbardziej dotkniętą tymi zakażeniami byli mężczyźni w wieku 31-40 lat, a następnie mężczyźni w wieku 51-60 lat. Natomiast zakażenia miejscowe występowały u kobiet i mężczyzn na porównywalnym poziomie, najczęściej u osób w wieku 51-60 lat. Odnotowałam następujące choroby towarzyszące u pacjentów z inwazyjnym zakażeniem *C. diphtheriae*: alkoholizm, marskość wątroby, udar mózgu, ropień wątroby, encefalopatia, owrzodzenia skórne, odmrożenia stóp. U

czworga pacjentów zdiagnozowano zapalenie wsierdzia. Co najmniej trzech pacjentów było bezdomnych. Jednakże w przypadku trzech pacjentów z inwazyjnym zakażeniem *C. diphtheriae* nie udało mi się ustalić żadnych chorób towarzyszących ani innych czynników ryzyka. Byli to wcześniej zdrowi mężczyźni w wieku 17, 24 i 37 lat.

Poczynione obserwacje porównałam z badaniami przeprowadzonymi w Niemczech, Wielkiej Brytanii, Francji, Szwajcarii i we Włoszech. Stwierdziłam, że w przeciwieństwie do Polski, w innych krajach zakażenia inwazyjne nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae* dotykały głównie osób młodych, w tym dzieci i były powodowane przez szczepy różniące się zarówno pod względem biotypu jak i pod względem genetycznym. Izolowany od pacjentów w Polsce od 9 lat jeden klon każe się zastanowić, czy w populacji polskiej krąży od lat jeden klon *C. diphtheriae* czy jest to klon o zwiększonych właściwościach patogennych wywołujący zakażenia. Niestety, ze względu na brak danych dotyczących nosicielstwa *C. diphtheriae* w populacji polskiej, pytanie to pozostaje bez odpowiedzi.

Przeprowadzone przeze mnie badania są zgodne z danymi piśmiennictwa wskazującymi, że zapalenie wsierdzia jest częstym powikłaniem zakażenia nietoksynotwórczymi *C. diphtheriae*. Jednak uzyskane przeze mnie wyniki nie potwierdzają obserwacji innych autorów, że zapalenie wsierdzia spowodowane zakażeniem *C. diphtheriae* występuje u osób z chorobami serca, sztucznymi zastawkami serca oraz u osób zażywających narkotyki drogą dożylną. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie analiz do wymienianych w piśmiennictwie czynników ryzyka inwazyjnego zakażenia *C. diphtheriae* takich jak bezdomność, uzależnienie od alkoholu, cukrzyca, używanie narkotyków drogą dożylną, można dodać marskość wątroby oraz próchnicę zębów. Co więcej, stwierdziłam że próchnica zębów jest bardzo prawdopodobnym miejscem wniknięcia tych patogenów do organizmu. Jest to pierwsza taka obserwacja na świecie. Należy również pamiętać, że zakażenia inwazyjne *C. diphtheriae* mogą także wystąpić u osób nie obarczonych czynnikami ryzyka. W swoich badaniach wysunęłam również przypuszczenie, że zakażeń inwazyjnych *C. diphtheriae* może być więcej, bo stwierdzenie wzrostu coryneform bakterii w próbkach krwi jest często traktowane jako zakażenie ze skóry podczas pobierania próbki i nie jest prowadzona dalsza identyfikacja drobnoustroju.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Podczas prowadzonych badań brałam udział w pracach międzynarodowego zespołu, który opracował metodę MLST do genotypowania *C. diphtheriae*, poddał genotypowaniu 150

szczepów wyizolowanych w 18 krajach oraz utworzył elektroniczną bazę danych genotypów występujących na świecie. Wyniki naszych prac zostały przedstawione w publikacji Bolt F i wsp. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Clin. Microbiol. 2010; **48:** 4177-4185.

Weszłam również w skład austriacko-polskiej grupy badaczy, która wyizolowała, scharakteryzowała i opisała nowy gatunek bakterii z rodzaju *Corynebacterium* (Frischmann A i wsp. *Corynebacterium epidermidicanis sp. nov.*, isolated from a dog's skin. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012; **62:** 2194-2200).

Ponadto, w swoich badaniach kontynuuję tematykę badawczą dotyczącą *Bacillus anthracis*, która była również tematem mojego doktoratu. Między innymi przeprowadziłam badania kilkuset próbek gleby pobranych na terenie Polski w rejonach, gdzie przed laty występowały zgony zwierząt na wąglik. Zbadałam również próbki gleby i osadów naniesionych przez wodę na terenach dotkniętych powodzią w 2010 roku. Celem tych badań była odpowiedź na pytanie, czy istnieje zagrożenie wystąpienia epidemii wąglika na tych terenach. Przetrwalniki *Bacillus antharcis* są wysoce oporne na wiele czynników środowiskowych i środków dezynfekcyjnych. W naturalnych warunkach do środowiska są uwalniane wraz z wyciekiem płynów ze zwłok zwierząt padłych na wąglik. Mogą przetrwać w glebie przez dziesiątki lat. Powodzie mogą nie tylko przenosić przetrwalniki w inne miejsca, ale także odsłaniać je z głębszych warstw gleby i powodować ich koncentrację na obszarach niżej położonych, co może prowadzić do wybuchu epidemii wąglika nawet na terenach, gdzie od wielu lat nie odnotowywano przypadków tej choroby, jak to miało miejsce m.in. na Słowacji czy w Szwecji[20]. Wyniki moich badań nie wykazały zwiększonego zagrożenia wystąpienia zachorowań na wąglik na badanych terenach. Zostały opisane w przyjętej do druku pracy Zasada AA i wsp. Screening for anthrax occurrence in soil on flooded rural areas in Poland after rainfalls in spring of 2010. Ann. Agric. Environ. Med. 2014.

Ponadto, swoje zainteresowanie badawcze sprzed doktoratu dotyczące nowoczesnych metod wykrywania i identyfikacji *Bacillus antharcis* poszerzyłam o inne wysoce patogenne bakterie, które mogą zostać użyte jako broń biologiczna, takie jak *Francisella tularensis,*

---

[20] Lewerin SS, Elvander M, Westermark T, i in. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: case report. Acta Vet Scand. 2010; 52: 7.

Yersinia pestis, Brucella sp. Wyniki swoich badań opublikowałam w następujących pracach: Zasada AA i wsp. Fast identification of *Yersinia pestis, Bacillus anthracis* and *Francisella tularensis* based on conventional PCR. Pol. J. Microbiol. 2013 (w druku); Zasada AA i wsp. Wykrywanie i identyfikacja wysoce patogennych bakterii w ramach międzynarodowego projektu EQADeBa – Część II: Próbki zawierające inaktywowane patogeny. Przegl. Epidem. 2012; **66:** 389-393; Fromińska K i wsp. Ocena przydatności metody multiplex PCR do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów z grupy *Bacillus cereus*. Med. Dośw. Mikrobiol. 2012; **64:** 101-108; Zasada AA. Ocena wpływu zastosowanych odczynników na szybkość uzyskania wyniku identyfikacji laseczki wąglika w teście RSI-PCR dla genu *plcR*. Med. Dośw. Mikrobiol. 2011; **63:** 321-326; Zasada AA i wsp. Wykrywanie i identyfikacja wysoce patogennych bakterii w ramach międzynarodowego projektu EQADeBa – Część I: Próbki zawierające żywe patogeny. Przegl. Epidem. 2011; **65:** 401-407; Gierczyński R i wsp. Specific *Bacillus anthracis* identification by a *plcR*-targeted restriction site insertion-PCR (RSI-PCR) assay. FEMS Microbiol. Lett. 2007; **272:** 55-59.

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących metod wykrywania *Legionella pneumofila* w próbkach materiału klinicznego oraz w badaniach dotyczących oceny częstości występowania krztuśca w populacji polskiej. Wyniki tych prac zostały opublikowane w następujących artykułach: Żak M i wsp. Development of a miniaturized DNA microarray for identification of 66 virulence genes for *Legionella pneumophila.* Postepy Hig. Med. Dosw. 2011; **65:** 838-848; Baczewska-Rej M i wsp. Comparison of sensitivity and specificity of three commercial assays (Biotest EIA, BinaxNOW and Uni-Gold) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. Adv. Clin. Exp. Med. 2010; **19:** 323-327; Stefanoff P i wsp. Incidence of pertussis in patients of general practitioners in Poland. Epidemiol. Infect. 2013; Jul 22:1-10 [EPub ahead of print]; Rastawicki W i wsp. Ocena wiarygodności poziomu przeciwciał przyjmowanego za diagnostycznie znamienny w serodiagnostyce krztuśca wykonanej odczynem ELISA. Med. Dośw. Mikrobiol. 2011; **63:** 73-80.