



# Prototekozy ludzi i zwierząt

## Protothecosis in humans and animals

Kinga Kułaga<sup>1, A–D</sup>, Henryk Krukowski<sup>1, D–F</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Kułaga K, Krukowski H. Prototekozy ludzi i zwierząt. Med Srod. 2021; 24(1–4): 18–24. doi: 10.26444/ms/142045

### ■ Streszczenie

**Wprowadzenie i cel.** Glony z rodzaju *Prototheca* to bardzo interesujące i wyjątkowe mikroorganizmy należące do królestwa roślin (*Regnum Vegetabile*), które są w stanie zakazić zwierzęta i ludzi, powodując choroby zwane prototekozami. Przez długi czas glony z rodzaju *Prototheca* nie były uznawane za patogeny groźne dla ludzi. Ewentualne izolacje tych mikroorganizmów z ran, krwi czy kału zazwyczaj interpretowano jako saprofity bądź też zanieczyszczenia. Celem pracy jest zaprezentowanie dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącego biologii, identyfikacji oraz chorobotwórczości dla ludzi i zwierząt bezchlorofilowych glonów z rodzaju *Prototheca*.

**Opis stanu wiedzy.** Prototekozy to dość nielicznie spotykane infekcje, wywoływane przez bezchlorofilowe glony z rodzaju *Prototheca*, które są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Glony te są patogenami dla zwierząt i człowieka. *Prototheca* spp. mogą powodować infekcje u ludzi, ale stanowią także problem w przypadku zakażeń zwierząt (przede wszystkim gdy wywołują zapalenie wymienia u krów mlecznych), przynosząc znaczące straty ekonomiczne. Budowa glonów z rodzaju *Prototheca* powoduje, że są one odporne na większość fungistatyków, antybiotyków, środków dezynfekcyjnych, a także cechują się opornością na wysokie temperatury.

**Podsumowanie.** Ze względu na zdolność glonów *Prototheca* do zakażenia organizmów zwierzęcych, jak i ludzkich oraz ich dużą oporność na wiele czynników i środków istotne jest pogłębienie wiedzy dotyczącej glonów *Prototheca* i lepsze poznanie tych niezwykle ciekawych mikroorganizmów, aby w przyszłości móc bardziej efektywnie leczyć prototekozy, które ze względu na zwiększającą się liczbę osób z obniżoną odpornością mogą dotyczyć coraz to więcej nie tylko zwierząt, ale także i ludzi.

### Słowa kluczowe

glony, chorobotwórczość, prototekozy, *Prototheca*

### ■ Abstract

**Introduction and objective.** The algae from the *Prototheca* genus are very interesting and unique microorganisms belonging to the plant kingdom (*Regnum Vegetabile*), which are capable of infecting animals and humans, causing a disease called protothecosis. For a long time, algae of the genus *Prototheca* were not recognized as pathogens dangerous to humans. Possible isolations of these microorganisms from wounds, blood or faeces were usually interpreted as saprophytes or impurities. The objective of the study is presentation of the current state of knowledge concerning the biology, identification and pathogenicity for animals and humans caused by achlorophyllic algae of the genus *Prototheca*.

**Brief description of the state of knowledge.** Protothecosis is a fairly rare infection caused by the achlorophyllic algae of the genus *Prototheca*, which are widespread in the environment. These algae are pathogens for animals and humans. *Prototheca* spp. may cause human infections, but they are also a problem in animal infections, mainly when it comes to mastitis in dairy cows, causing far-reaching economic losses. The structure of *Prototheca* algae makes them resistant to most fungistatics, antibiotics, and disinfectants, and is also resistant to high temperatures.

**Summary.** Due to the capability of infecting animal and human organisms, and wide resistance to many factors and agents, it is important to deepen the knowledge concerning *Prototheca* algae and better recognize these extremely interesting microorganisms, in order to be able to cure protothecosis more effectively in the future. Considering an increasing number of people with reduced immunity this disease may affect an increasing number of humans; however, also animals.

### Key words

algae, pathogenicity, protothecosis, *Prototheca*

## WPROWADZENIE

Prototekozy są to choroby zarówno zwierząt, jak i ludzi, wywołane przez oportunistyczne patogenne glony z rodzaju *Prototheca*. Rodzaj *Prototheca* należy do domeny *Eukaryota*, królestwa *Viridiplantae*, gromady *Chlorophyta*, klasy *Trebouxiophyceae*, rzędu *Chlorellales*, rodziny *Chlorellaceae*. Prototekozy są rzadko diagnozowane, posiadają zróżnicowany obraz kliniczny i powodują dość wysoką śmiertelność. Aktualnie

do rodzaju *Prototheca* zalicza się piętnaście gatunków alg, z czego dwa gatunki uważa się za najczęściej wywołujące prototekozy. Pierwszym gatunkiem jest *Prototheca wickerhamii*, który najczęściej odpowiada za zakażenia u ludzi, zaś drugim *Prototheca bovis*, który najczęściej wywołuje zakażenia u zwierząt. Przez długi czas glony z rodzaju *Prototheca* nie były uznawane za patogeny groźne dla ludzi. Ewentualne izolacje tych mikroorganizmów z ran, krwi czy kału zazwyczaj interpretowano jako saprofity bądź też zanieczyszczenia. Glony te posiadają niewielką zjadliwość u ludzi z prawidłowo działającym układem odpornościowym a infekcje zazwyczaj rozprzestrzeniają się bardzo powoli na

Adres do korespondencji: Henryk Krukowski, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin, Polska  
E-mail: henryk.krukowski@up.lublin.pl

niewielkich obszarach, są więc nielicznie opisywane jako patogeny oportunistyczne. Gatunki *Prototheca* spp. rzadko są opisywane jako patogeny występujące w organizmach osób z nowotworami złośliwymi, neutropenią czy też u pacjentów z ludzkim wirusem upośledzenia odporności HIV, co może sugerować, iż *Prototheca* spp. posiada niski potencjał patogenny, jednak u takich ludzi przebieg może być znacznie cięższy niż u osób zdrowych, co za tym idzie zakażenie może stanowić duże zagrożenie. Glony *Prototheca* spp. są mikroorganizmami wszechobecnymi w środowisku naturalnym i mogą być rutynowo izolowane zarówno z gleby, wody słodkiej, wody słonej, śluzu drzewnego, jak i powierzchni roślin. Mogą one występować także jako przejściowa flora w przewodniku pokarmowym ludzi i zwierząt. Zdarza się, iż są kolonizatorami bezobjawowymi ludzkiej skóry czy łożyska paznokci. Ponieważ glony z rodzaju *Prototheca* są saprofitami i potrzebują ciągłego dostępu do rozkładającego się bądź też lekko strawionego pożywienia, częściej możemy znaleźć je w obornikach, ściekach czy odchodach. Saprofity te dodatkowo możemy spotkać w wielu produktach spożywczych, takich jak: mięso wieprzowe, mięso wołowe, krowie mleko czy owoce morza [1–5].

## CEL PRACY

Celem pracy jest zaprezentowanie dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącego biologii, identyfikacji oraz chorobotwórczości dla ludzi i zwierząt bezchlorofilowych glonów z rodzaju *Prototheca*.

## STAN WIEDZY

### Historia odkrycia i systematyka alg *Prototheca* spp.

Algi z rodzaju *Prototheca* wyizolowane i wyhodowane zostały po raz pierwszy w 1880 roku przez Zopfa i Kühna z przyranych wycieków *Tillia* spp. oraz *Ulmus* spp. Ze względu na cechy morfologiczne mikroorganizmy te zaliczone zostały do drożdżaków. Następnie w roku 1894 pierwszy raz zostały one w pełni scharakteryzowane i opisane przez Wilhelma Krügera; dotyczyło to gatunków: *Prototheca zopfii* oraz *Prototheca moriformis*. Sklasyfikowanie glonów z rodzaju *Prototheca* sprawiło naukowcom wiele problemów ze względu na wiele niezgodności. Początkowo klasyfikowano *Prototheca* spp. jako drożdżaki, później jako grzyby. W 1913 roku Chodat przeklasyfikował je i włączył do glonów ze względu na sposób rozmnażania identyczny jak u *Chlorella* spp. W roku 1927 Printz potwierdził przeklasyfikowanie Chodata i wyodrębnił nowy rodzaj *Prototheca*. W 1959 roku Tubaki i Soneda zidentyfikowali *Prototheca wickerhamii*. W roku 1965 Krauss i Shihira wykazali podobieństwo *Prototheca zopfii* do *Chlorella protothecoides*. W 1968 roku Cooke zidentyfikował natomiast *Prototheca stagnora*. W roku 1972 Arnold i Ahearn badali wzorce przyswajania alkoholu i węglowodanów przez rodzaj *Prototheca*. Po badaniach przyporządkowali oni do rodzaju *Prototheca* pięć gatunków: *P. zopfii*, *P. moriformis*, *P. stagnora*, *P. wickerhamii* i *P. filamenta*. W 1985 roku Pore po przeanalizowaniu rodzaju *Prototheca* uznał *P. wickerhamii*, *P. zopfii*, *P. stagnora* i *P. moriformis* za prawidłowe gatunki. Do 2018 roku do rodzaju *Prototheca* zaliczano: *P. zopfii*, *P. stagnora*, *P. wickerhamii*, *Prototheca ulmea* oraz *Prototheca blaschkeae*. W 2019 roku T. Jagielski wraz z innymi

badaczami z Uniwersytetu Warszawskiego zmienili stanowisko taksonomiczne niektórych alg z rodzaju *Prototheca*. *P. zopfii* genotyp 1 został zmieniony na *Prototheca cifferrii*, *P. zopfii* genotyp 2 zmieniono natomiast na *Prototheca bovis* [4, 6, 7].

### Biologia *Prototheca* spp.

Glony *Prototheca* spp. są szeroko rozpowszechnionymi mikroorganizmami. Saprofity te rozprzestrzeniły się w różnych środowiskach o wysokiej wilgotności. Obecnie są izolowane m.in. w wodzie słodkiej, słonej, w ziemi, na roślinach czy w ściekach. Dodatkowo możemy je znaleźć w odchodach zwierzęcych, ludzkich czy w wielu produktach spożywczych, takich jak: mięso wieprzowe, mięso wołowe, krowie mleko czy owoce morza. Algi z rodzaju *Prototheca* są to jednokomórkowe mikroorganizmy o średnicy wynoszącej od 3 do 30  $\mu\text{m}$  (4). Są one okrągłe bądź owalne, a ich wielkość i kształt są zależne m.in. od stadium rozwojowego, w jakim się znajdują, gatunku czy też od rodzaju i składu podłoża, na jakim rosną. Glony z rodzaju *Prototheca* posiadają centralnie położone, niewielkie jądro oraz zasadochłonną cytoplazmę posiadającą nieliczne ziarnistości. W odróżnieniu od glonów *Chlorella* nie posiadają chloroplastów i co za tym idzie – chlorofilu. Mikroorganizmy te od zewnątrz otacza ściana komórkowa, która składa się z dwóch warstw: wewnętrznej i zewnętrznej, w odróżnieniu od glonów *Chlorella*, które posiadają trzy warstwy ściany komórkowej. Wewnętrzna warstwa jest cieńsza od zewnętrznej. Zewnętrzna warstwa ściany komórkowej ze względu na swoją grubość jest oporna na działanie wielu enzymów, m.in.: hialuronidazy, trypsyny, chitynazy czy glukuronidazy. Ściana komórkowa jest także oporna na działanie wielu środków biobójczych oraz wysokie temperatury. Oporność ta najprawdopodobniej wynika z obecności kompleksu utlenionych polimerów bądź estrów karotenoidowych – tzw. sporopolleniny, która wchodzi w skład ściany komórkowej. W odróżnieniu od grzybów algi z rodzaju *Prototheca* nie posiadają specyficznego dla nich składnika ściany komórkowej, czyli glukozaminy. Natomiast w odróżnieniu od bakterii nie posiadają w swojej ścianie komórkowej kwasu muraminowego. Glony z rodzaju *Prototheca* są heterotrofami potrzebującymi zewnętrznych źródeł azotu oraz węgla organicznego. Te bezchlorofilowe mikroorganizmy rosną w warunkach tlenowych, do wzrostu potrzebują tiaminy, czyli witaminy B1, rosną na podłożach, które posiadają w składzie glukozę. Światło nie przyspiesza natomiast wzrostu tych glonów. Optymalny rozwój wykazują w temperaturze 30–32°C, gorzej rosną w temperaturze poniżej 20°C i powyżej 38°C [4, 6, 8]. Cykl życiowy alg *Prototheca* spp. jest podobny do cyklu rozwojowego glonów z rodzaju *Chlorella*. Aktualnie nie zarejestrowano jeszcze płciowego sposobu rozmnażania. Glony z rodzaju *Prototheca* rozmnażają się w sposób bezpłciowy, przez podział. Rozmnażanie przez podział może nastąpić na dwa sposoby. Pierwszy sposób to jednorazowy podział jądra komórkowego i cytoplazmy. W wyniku tego podziału powstają dwie protospory, które dzielą się dalej, kolejny raz. Drugim sposobem jest podwójny bądź potrójny podział jądra i cytoplazmy, w wyniku czego powstaje wewnątrz macierzystej komórki, czyli sporangiospory, wiele komórek potomnych – endospor. Zazwyczaj powstają sporangia składające się z ok. 2 do 20 komórek potomnych, np. sporangiospory *P. zopfii* (obecnie *P. bovis*) zawierają od 2 do 16 endospor, chociaż istnieją wyjątki, np. sporangiospory *Prototheca wickerhamii* zawierają

ich nawet 50. Powstałe endospory mają średnicę ok. 4–5  $\mu\text{m}$ . Komórka macierzysta pęka, uwalniając zakaźne endospory, które po przekształceniu się w dojrzałe komórki zapętlają cykl. Od ok. 1 do 3% sporangiów dzieli się w inny sposób, tworząc 2 lub 3 komórki spoczynkowe o grubych ścianach, tzw. hypnosporę [4].

### Identyfikacja i diagnostyka alg *Prototheca* spp.

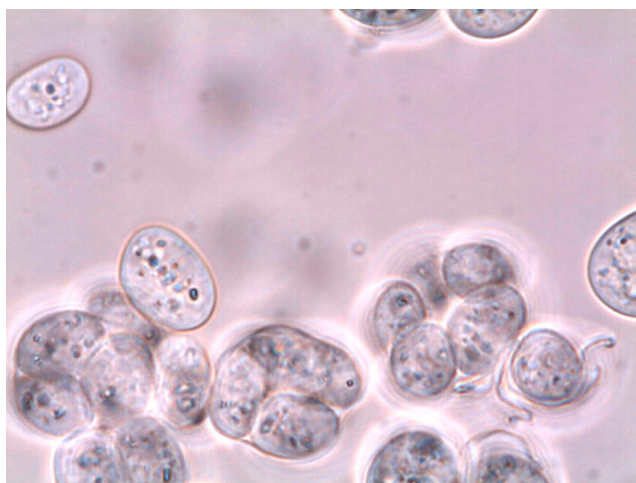
Głony z rodzaju *Prototheca* nie wymagają specjalnych podłoży; gdy badany materiał nie jest mocno zanieczyszczony, nie zawiera dużej liczby innych drobnoustrojów. Algi z rodzaju *Prototheca* dobrze wzrastają na podłożu agarowym z krwią czy też na podłożu Sabourauda z dekstrozą. Przy dodatku aktidionu, czyli cykloheksamidu produkowanego przez promieniowca *Streptomyces griseus*, do podłoża Sabourauda wzrost tych mikroorganizmów zostanie zahamowany. Wzrost hamuje także tetracyklina, ketokonazol, amfoterycyna oraz temperatura powyżej 40°C. W sytuacji gdy próbki materiału są zanieczyszczone i mogą zawierać dużą ilość innych mikroorganizmów (np. próbki wody ze strumieni, ścieków czy gleby), w celu zminimalizowania wzrostu bakterii można użyć chloramfenikol w stężeniu 100 mg/l. Stosuje się także wybiórcze podłoża: PIM, czyli *Prototheca Isolation Medium*, zawierające połączenie flucytozyny i wodorofalenu potasu, oraz PEM, czyli *Prototheca Enrichment Medium* [4]. W zależności od gatunku wygląd kolonii jest różny. Głony z rodzaju *Prototheca* optymalnie rosną w temperaturze 25–37°C. Na podłożu agar z krwią już po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C glony te zaczynają wzrastać, tworząc niewielkie białoszare bądź białe kolonie. Gdy glony wysieje się na podłożu Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu i przedłuży dwukrotnie czas inkubacji, wyrosnięte kolonie są większe, białoszare, kremowe bądź białe i w zależności od gatunku ich wygląd oraz wielkość są odmienne (ryc. 1).



Rycina 1. Wzrost glonów *Prototheca* na podłożu Sabourauda (zdj. K. Kułaga)

W przypadku większości gatunków alg z rodzaju *Prototheca* optymalny ich wzrost następuje po 72 godzinach inkubacji w temperaturze ok. 30°C, chociaż niektóre gatunki do wzrostu potrzebują temperatury niższej, ok. 25°C, i o wiele dłuższej inkubacji, wynoszącej ok. 7 dni. Do wzrostu glony *Prototheca* spp. potrzebują tlenu bądź warunków mikroaerofilnych, czyli takich, w których stężenie tlenu wynosi ok. 20% [4]. Algi z rodzaju *Prototheca* barwią się metodą Grama oraz błękitem metylenowym. Do barwienia wykorzystywany jest także barwnik PHOL (akronim od nazwisk Pal, Hasegawa, Ono i Lee), służący głównie do barwienia prób środowiskowych i klinicznych glonów *Prototheca* spp. W 2020 roku zastosowano nową technikę barwienia glonów *Prototheca* spp., przy wykorzystaniu której głównymi składnikami

chemicznymi były chromotrop 2R, błękit anilinowy i kwas fosforogonowy. Barwienie to wykazuje bardzo wyraźne powinowactwo do barwienia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych mikroglonów *Prototheca*. W obrazie mikroskopowym można dostrzec sporangia z obecnymi wewnątrz endosporami, Gramododatnie, owalne bądź też okrągłe, duże uwolnione endospory, które łączą się ze sobą na kształt moruli, oraz puste sporangia, które pozostały po wydostaniu się z nich endospor [9]. Po wysianiu próby na podłożu Sabourauda istnieje duże podobieństwo w morfologii pomiędzy glonami z rodzaju *Prototheca* a grzybami drożdżopodobnymi, stąd też dość często są one błędnie identyfikowane. Dzięki badaniu pod mikroskopem można efektywnie je rozróżnić (ryc. 2).



Rycina 2. Głony *Prototheca* pod mikroskopem, pow. 100x (zdj. H. Krukowski)

Komórki zarodnikowe drożdżaków są mniejsze i tworzą strzępki bądź też pseudostrzępki z dostrzegalnymi postaciami pączkującymi, których nie tworzy *Prototheca* spp. Nie posiadają pękniętych ścian komórkowych z widocznymi w środku endosporami. Istnieją różnice pozwalające na odróżnienie od siebie poszczególnych gatunków alg z rodzaju *Prototheca*, są to m.in.: temperatura, w której gatunki zdolne są do wzrostu, wygląd kolonii, wrażliwość na antybiotyki oraz wzory asymilacji. Przedstawiono to na przykładzie dwu gatunków najważniejszych ze względu na chorobotwórczość dla ludzi i zwierząt:

- *P. wickerhamii* – wielkość komórek tego gatunku mieści w granicach od 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Kolonie są lekko wypukłe, posiadają równy brzeg i są błyszczące. *P. wickerhamii* ma tendencję do tworzenia symetrycznych form w kształcie moruli. Mikroorganizmy te dobrze rosną w temperaturze 37°C. *P. wickerhamii* asymiluje glukozę, glicerol, trehalozę oraz galaktozę w ciągu 7 dni, nie asymiluje natomiast n-propanolu. Gatunek ten jest wrażliwy na neomycynę oraz klotrimazol.
- *P. bovis* – kolonie tego gatunku są płaskie, matowe i szorstkie, posiadają postrzępiony brzeg. Wielkość komórek to ok. 7–30  $\mu\text{m}$ . *P. bovis* dobrze rośnie w temperaturze 37°C. Asymiluje glukozę, n-propanol i glicerol, natomiast nie asymiluje galaktozy i trehalozy. Gatunek ten nie jest wrażliwy na klotrimazol, natomiast wykazuje wrażliwość na neomycynę [4].

Do identyfikacji glonów z rodzaju *Prototheca* w celu rozróżniania gatunków wykorzystywane są coraz częściej

metody molekularne. Metody te posiadają zwykle lepiej sprecyzowany schemat identyfikacji i są skuteczniejsze niż metody fenotypowe. Bardzo często wykorzystywaną jest łańcuchowa reakcja polimerazy, podczas której amplifikowane są konkretne regiony genów rDNA. Oprócz łańcuchowej reakcji polimerazy wykorzystuje się także różnego rodzaju jej modyfikacje, takie jak: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych RFLP czy PCR w czasie rzeczywistym – Real-time PCR. Przykładowo za pomocą metody PCR-RFLP, analizując gen 18S rDNA, można odróżnić od siebie 4 gatunki alg z rodzaju *Prototheca*: *P. ciferrii* (dawniej *P. zopfii* genotyp 1), *P. blaschkeae*, *P. ulmea* oraz *Prototheca cutis*. Innym przykładem może być wykorzystywanie techniki PCR-HRM – High Resolution Melting Real Time PCR, czyli PCR z wysokorozdzielczą analizą temperatur topnienia produktu, która zostaje wykorzystywana do typowania glonów z rodzaju *Prototheca* przez badanie regionu 18S rDNA. Stosując tę metodę, po wykonaniu analiz komputerowych wykazano, iż najwyższe krzywe topnienia dotyczyły *P. blaschkeae*, najniższe zaś *P. wickerhamii* [10–13]. Dodatkowo wykorzystywana jest także MALDI-TOF MS-Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, czyli spektroskopia masowa z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą i czasem przelotu, która pozwala na szybkie rozróżnienie aż siedmiu patogennych i niepatogennych gatunków alg z rodzaju *Prototheca*. Metoda ta jest znacznie szybsza oraz tańsza niż rutynowe badania wykonywane za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy, jak i jej modyfikacji [14–16].

W 2018 roku T. Jagielski i wsp. zaproponowali mitochondrialny gen *cytb* jako nowy i rzetelny marker do diagnostyki i badań filogenetycznych alg *Prototheca* [17]. W 2020 roku do wykrywania glonów *Prototheca* spp. w tkankach po raz pierwszy zastosowano mikroskop kontrastowo-fazowy, którego działanie opiera się na tym, iż różne części żywych komórek charakteryzują się różną gęstością i odbijają światło w różnym stopniu oraz dają odmienne parametry refrakcji światła. Po przeprowadzeniu badań uznano tą metodę za proste i szybkie narzędzie do wykrywania alg *Prototheca* spp., ze względu na obecność w ścianach alg sporopolleniny, która nie występuje w tkankach zwierzęcych [9].

### Protokozy u ludzi

Protokozy u ludzi diagnozowane są na całym świecie oprócz Antarktydy. Większość osób, u których zdiagnozowano protokozy, ma więcej niż 30 lat. Istnieją jednak opisane przypadki dotyczące dzieci i noworodków. Protokozy ludzi są infekcjami rzadko diagnozowanymi, lecz mogącymi wywołać ciężkie postaci choroby u osób z immunosupresją. Czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania są m.in.: leczenie miejscowymi bądź ogólnoustrojowymi kortykosteroidami, nowotwory, cukrzyca, zespół nabytego upośledzenia odporności – AIDS, przeszczepy, alkoholizm, poddawanie się dializom czy choroby autoimmunologiczne. Najczęściej izolowanym gatunkiem glonów z rodzaju *Prototheca* u ludzi jest *P. wickerhamii* [4, 18, 19]. Pierwszy przypadek protokozy u człowieka został opisany w roku 1964. Przypadek ten dotyczył rolnika uprawiającego ryż, mieszkającego w Sierra Leone, u którego zdiagnozowano wrzód skórny na stopie spowodowany glonami z rodzaju *Prototheca*. Do sierpnia 2020 roku zgłoszono 266 zdiagnozowanych przypadków protokozy u ludzi. W większości przypadków źródłem infekcji był kontakt egzogenny ze skażoną wodą bądź też glebą, często występujący po urazie mechanicznym. Znane są też

przypadki infekcji, które były powikłaniami po zabiegach operacyjnych. Okres inkubacji zakażenia nie jest dobrze poznany, według dostępnych raportów czas inkubacji waha się od 10 dni do nawet 4 miesięcy. U człowieka występują trzy postaci kliniczne protokozy: postać skórna, zapalenie kaletki wyrostka łokciowego oraz postać ogólnoustrojowa lub rozsiana. Najczęstszą postacią kliniczną protokozy u ludzi jest postać skórna, która dotyczy ok. połowy opisanych do tej pory przypadków na świecie i głównie dotyka osób z poważnymi upośledzeniami odporności, lub osób z kilkoma wyniszczającymi chorobami układowymi. Jest to ok. 66% wszystkich opisanych przypadków. Często występującymi czynnikami ryzyka skórnej postaci protokozy są cukrzyca oraz przewlekłe stosowanie steroidów, znacznie mniejszy udział procentowy zakażeń stanowią nowotwory. Najczęściej atakowane są odsłonięte obszary skóry, głównie: twarz, skóra głowy, szyja, kończyny dolne oraz dolne części kończyn górnych: dłonie, palce, nadgarstki, przedramiona. Postać skórna zakażenia rozwija się bardzo powoli, a zmiany na skórze mają różny wygląd. Mogą występować: grudki, owrzodzenia, guzki, wykwity, pęcherzyki, krosty, brodawki, wrzody, a także zmiany z hipopigmentacją czy zmiany opryszczkowe. Najczęstszym objawem są pęcherze, strupy oraz wrzodziejące, ropne wykwity. Zmiany dotyczą zarówno skóry, jak i tkanki podskórnej. Ponieważ wyniki kliniczne mogą być mało specyficzne z morfologicznego punktu widzenia, do diagnozy protokozy zwykle stosuje się badanie histopatologiczne, które następnie potwierdza się badaniami mikrobiologicznymi. W biopsji zakażonych pacjentów zwykle występują ziarniakowate nacieki zapalne, dość często z domieszką eozynofili, neutrofilii, komórek olbrzymich oraz komórek plazmatycznych. W niektórych miejscach można zauważyć martwicę pewnego obszaru skóry [4, 19–25]. Kolejną postacią protokozy występującej u ludzi jest zapalenie kaletki wyrostka łokciowego. Stanowi ona ok. 15% aktualnie zdiagnozowanych przypadków. Najbardziej prawdopodobną przyczyną zakażenia glonami z rodzaju *Prototheca* w przypadku tej postaci jest uraz bądź otarcie łokcia. Przyczyna zakażeń akurat tego obszaru ciała jest nie do końca wyjaśniona, lecz może ono zależeć od predyspozycji tego obszaru do częstych, powtarzających się kontuzji. Istnieją udokumentowane przypadki, gdzie zapalenie kaletki wyrostka łokciowego spowodowane przez glony z rodzaju *Prototheca* nastąpiło po zanieczyszczeniu rany, np. podczas oczyszczania zanieczyszczonych przez *Prototheca* spp. zbiorników wodnych. Objawy przy tej postaci zakażenia pojawiają się stopniowo, kilka tygodni po urazie i charakteryzują się lekkim stwardnieniem kaletki łokciowej. Przy dotyku łokieć jest tkliwy, widoczny jest rumień oraz wydzielający się surowiczo-krwisty płyn w zmiennych ilościach [4, 24, 25, 26]. Ostatnią postacią protokozy występującej u człowieka jest postać rozsiana lub ogólnoustrojowa. Aktualnie postać ta stanowi ok. 19% wszystkich zdiagnozowanych na świecie przypadków. Zazwyczaj występuje ona u osób z immunosupresją. Zdiagnozowane przypadki dotyczyły pacjentów z AIDS, cukrzycą, rakiem czy osób po przeszczepie nerki. Przykładami przypadków osób u których wykryto zakażenie glonami z rodzaju *Prototheca* mogą być: pacjentka chora na cukrzycę z licznymi przerzutami raka piersi; nastoletnia dziewczyna z przewlekłym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych; mężczyzna z anemią, ropniem wątroby oraz zapaleniem opon mózgowych; kobieta z AIDS, zapaleniem opon mózgowych, pijąca alkohol i zażywająca dożylnie narkotyki;

dziecko chore na białaczkę czy sześciomiesięczne dziecko z wrodzonym wodogłowie, które zakażone zostało podczas zabiegów pielęgnacyjnych drenażu brzuszno-otrzewnowego [25, 27–30]. Przypadków protokozy u ludzi na całym świecie jest niewiele w porównaniu z zakażeniami innymi patogenami, jednak zakażeń ciągle przybywa. Do tej pory nie ma jednej wystandaryzowanej i skutecznej w odniesieniu do wszystkich postaci protokozy procedury, która kończyłaby się w każdym przypadku wyleczeniem pacjenta. Najczęściej w leczeniu chorych na protokozy wykorzystuje się amfoterycynę B, czasami stosuje się także imidazole, polimiksynę B czy neomycynę. Jednakże wszystkie ww. leki nie zawsze przynoszą efekt w postaci wyzdrowienia osoby zakażonej, a przypadki znacznie się od siebie różnią. Niekiedy przy infekcjach powierzchniowych chirurgiczne dopuszczalne jest wycięcie zakażonej tkanki, na której znajdują się zmiany. Procedura ta w kilku opisanych przypadkach okazała się skutecznym sposobem leczenia. W przypadku zmian skórnych do leczenia miejscowego wykorzystywany jest nadmanganian potasu, chlorheksydyna, kwas pikrynowy, jodek potasu, związki amoniowe czy też siarczan miedzi. Stosowanie różnych schematów leczenia nie zawsze kończy się sukcesem, jednak obecnie najbardziej skuteczne wydaje się użycie amfoterycyny B [4, 31].

### Protokozy zwierząt

Protokozy u zwierząt występują głównie u krów w postaci zapalenia gruczołu mlekowego (mastitis), chociaż dotychczas opisano także przypadki protokozy u innych gatunków zwierząt, takich jak m.in.: psy, koty, kozy, konie, ryby czy bobry [3, 32, 33].

### Psy

Najczęstszymi gatunkami wywołującymi protokozy u psów są *Prototheca bovis* oraz *Prototheca wickerhamii*, które mogą powodować patologie w obrębie skóry, narządu wzroku, dystalnego odcinka układu pokarmowego, układu moczowego czy ośrodkowego układu nerwowego. U psów po zakażeniu glonami *Prototheca* notuje się ostre zakażenia gałki ocznej powodujące nagłą ślepotę zwierząt, przekrwienie gałek ocznych, obfite surowicze łzawienie oraz pogorszoną reakcję źrenic, w skrajnie ciężkich przypadkach może dochodzić do odklejenia siatkówki i krwotoków siatkówkowych. Uciążliwe biegunki śluzowe i krwiste są następstwem zapalenia jelita grubego. Jeżeli chodzi o zmiany na skórze, to dotyczą one głównie kończyn i występują w postaci wielu ognisk wrzodziejących lub guzkatych zmian, które trudno jest wyleczyć. Zmiany skórne mogą występować samodzielnie lub przechodzić w inne postaci choroby. Zaburzenia neurologiczne związane z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych mogą natomiast obejmować zaburzenia umysłowe i ruchowe, ślepotę, głuchotę, napady padaczkowe, ataksje i różnego rodzaju porażenia. Rzadziej obserwowane objawy kliniczne mogą odzwierciedlać zakażenie innych narządów, m.in. nerek (objawy mocznicy), powiększenie węzłów chłonnych, kulawiznę, która może być spowodowana zapaleniem kości i szpiku, czy nagłą śmiercią z powodu nawrotowego zapalenia mięśnia sercowego. Glony z rodzaju *Prototheca* mogą wywołać także ropne zapalenie nerek, które powodowane jest zazwyczaj przez *Prototheca bovis* [2, 3, 34, 35].

### Koty

Protokozy u kotów są bardzo rzadką chorobą ze względu na naturalną odporność tych zwierząt na infekcję oraz być może unikanie przez nie nisz ekologicznych, w których bytują glony. Przypadki zakażenia glonami z rodzaju *Prototheca* u kotów obejmują głównie obszary nosa, małżowin usznych, czoła, nasady ogona lub dystalnych części kończyn. Zakażenie ma zazwyczaj łagodny przebieg skórnej postaci protokozy. Na wymienionych obszarach mogą pojawiać się skórne bądź podskórne guzki [3, 36].

### Kozy

Przypadki opisanych protokozy u kóz odnoszą się do gatunku *Prototheca wickerhamii*. Protokozy u tych zwierząt objawiają się śluzowo-ropną wydzieliną z nosa, dusznością wdechową, kaszlem oraz guzkami (niekiedy owrzodzonymi) na wargach, nosie czy głowie. Opisane są przypadki zmian histopatologicznych obejmujących martwicze zapalenie skóry oraz nieżyt nosa czy nawet zapalenie kości i szpiku. Przeważnie protokoza u kóz charakteryzuje się przewlekłą, powoli rozwijającą się infekcją, powodującą nierzadko wieloogniskowe, ropne, martwicze i wrzodziejące zmiany skórne [3, 37].

### Konie

Protokozy u koni są rzadkie i dotyczą układu oddechowego. Opisany przypadek zakażenia dotyczy infekcji spowodowanej glonami *Prototheca* spp. powodującej nieżyt nosa a w konsekwencji martwicze zapalenie zatok [33].

### Ryby

W roku 1980 został opisany przypadek zakażenia łososi na farmie rybnej. Mikroorganizmy były licznie wyizolowane z narządów trzewnych tych ryb. W roku 2017 został odnotowany pierwszy przypadek protokozy u karpia *Cyprinus caprio*, który zarazem był pierwszym przypadkiem zakażenia ryby glonami *Prototheca* potwierdzonym metodami zarówno fenotypowymi, jak i molekularnymi [32].

### Bydło

Najczęstszą protokoza u zwierząt jest zapalenie wymienia u bydła mlecznego wywoływane głównie przez gatunek *Prototheca bovis*, dawniej *Prototheca zopfii* genotyp 2, a także *Prototheca blaschkeae*. Uważa się, iż w Polsce *Prototheca bovis* jest głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń mastitis u krów mlecznych. Protokoza gruczołu mlekowego jest bardzo poważną patologią, która niestety pociąga za sobą duże straty przemysłowe, jak i ekonomiczne, ze względu na fakt poważnego obniżenia produkcji i jakości mleka oraz konieczności eliminowania zakażonych krów. W ostatnich latach mimo wcześniejszego niewielkiego odsetka przypadków mastitis powodowanych przez glony *Prototheca* tendencja do zachorowań zwiększa się. Skala problemu dotycząca zakażeń krów przez glony *Prototheca* może być niedoszacowana i wynika z błędnej izolacji i identyfikacji tych glonów. Glony z rodzaju *Prototheca* mogą być mylone z grzybami z rodzaju *Candida*. Pierwszy przypadek mastitis wywołany przez gatunek glonu z rodzaju *Prototheca* na świecie został opisany w roku 1952 przez Lercha, natomiast w Polsce nastąpiło to w roku 2002. Przypadek ten został udokumentowany przez E. Malinowskiego i wsp. [38]. Największą liczbę przypadków odnotowano natomiast w Brazylii; zakażone *Prototheca* spp. krowy zdiagnozowano w wielu krajach, m.in.:

Wielkiej Brytanii, USA, Włoszech, Niemczech, Belgii, Danii, Rumunii, Kanadzie, Nowej Zelandii, Serbii i Czarnogórze, Egipcie, Portugalii, Chinach czy Japonii [6, 7, 38, 39, 40–42]. Do zakażenia krów mastitis, czego konsekwencją jest zapalenie wymienia, dochodzi, gdy w pobliżu jest bardzo duża ilość glonów z rodzaju *Prototheca*. Zakażenie następuje przy kontakcie tych mikroorganizmów z kanałem strzykowym krowy, często na skutek urazu podczas doju mechanicznego i zanieczyszczenia ujścia strzyków. Pojedyncze sporangiospory bądź endospory glonów *Prototheca* dostają się do komórek nabłonka gruczołu mlekowego. W odpowiedzi na kontakt z patogenem komórki te inicjują zapalną odpowiedź immunologiczną. Po naruszeniu mechanizmów obronnych nabłonka glony *Prototheca* mogą atakować makrofagi, powodując, iż patogen staje się bardziej niedostępny dla antybiotyków i trudniej wykryć go metodami diagnostycznymi [44, 45]. Mastitis u krów spowodowane przez glony *Prototheca* spp. nie poddają się leczeniu. Glony te są odporne na większość powszechnie stosowanych leków i nie dają pozytywnych rezultatów podczas terapii. Niestety do tej pory jedyną metodą, aby zakażenie nie rozprzestrzeniło się na kolejne osobniki, jest odizolowanie od stada zakażonego osobnika i poddanie ubojowi [6, 10]. Z epidemiologicznego punktu widzenia zakażone glonami z rodzaju *Prototheca* bydło może być źródłem protokozy występujących u ludzi, głównie rolników z immunosupresją, gdyż *Prototheca* spp. może przetrwać m.in. chlorowanie poprzez tworzenie biofilmu i powtórnie trafiać do środowiska przez odpady czy ścieki z gospodarstw domowych, zwiększając ewentualną możliwość zarażenia człowieka [31, 32, 46].

T. Jagielski i wsp. [47] w 2019 roku przedstawili wyniki pierwszego w Polsce, szeroko zakrojonego badania dotyczącego występowania *Prototheca* spp. u krów mlecznych i w ich środowisku. W sumie pobrano i poddano analizie mikrobiologicznej 1211 próbek. W tej liczbie uwzględniono mleko (n = 638), wymazy z ciała krów (n = 374) oraz próbki środowiskowe (n = 199). Próbki pochodziły od 400 krów mlecznych (oraz ich otoczenia) z 16 gospodarstw mlecznych zlokalizowanych we wszystkich województwach. *Prototheca* spp. były trzecimi, po *Streptococcus* i *Staphylococcus* spp., najczęstszymi patogenami powodującymi zapalenie wymienia.

## PODSUMOWANIE

Bezchlorofilowe glony z rodzaju *Prototheca* ze względu na swój patogenny charakter wobec zarówno zwierząt, jak i człowieka są ciągłym obiektem badań i tematem wielu prac naukowych. Ze względu na znaczną oporność na antybiotyki, środki dezynfekcyjne oraz wysoką temperaturę stanowią one zagrożenie dla różnych gatunków zwierząt, głównie dla bydła, powodując zapalenie wymienia, co pociąga za sobą znaczne straty ekonomiczne, ale i stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi. Mimo niewielkiej i sporadycznej skali problemu, jaki stanowią protokozy, glony z rodzaju *Prototheca* występują prawie na całym świecie i są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym. Ponieważ problem protokozy ciągle istnieje, wszystkie wykonywane badania powinny być dalej rozszerzane, aby można było jeszcze lepiej poznać te zaskakująco ciekawe mikroorganizmy, lepiej diagnozować przypadki zachorowań i efektywnie leczyć pacjentów [48].

## PIŚMIENNICTWO

1. Rudna J, Bakuła Z, Jagielski T. Występowanie glonów z rodzaju *Prototheca* w środowisku naturalnym. Post Mikrobiol. 2019; 58(1): 94.
2. Moneta S, Bakuła Z, Jagielski T. Lekowrażliwość i typowanie genetyczne szczepów *Prototheca* spp. izolowanych z przypadków protokozy u psów. Post Mikrobiol. 2019; 58(1): 102.
3. Pal M, Abraha A, Rahman T Md, et al. Protothecosis: an emerging glonal disease of humans and animals. Int J Life Sci Biotech Pharm Res. 2014; 3(4): 1–13.
4. Lass-Flör C, Mayr A. Human protothecosis. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(2), 230–242.
5. Hillesheim P B, Bahrami S. Cutaneous protothecosis. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135: 941–944.
6. Krukowski H. Zapalenia wymienia u krów wywołane przez grzyby i glony. cz.2. Protokoza wymienia. Magazyn hodowcy 2014; 1: 22–27.
7. Jagielski T, Karnkowska A, Bakuła Z, et al. The genus *Prototheca* (Trebouxiphyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. Glonal Res. 2019; 43: 101639.
8. Milanov D, Petrović T, Polaček V, et al. Mastitis associated with *Prototheca zopfii* – an emerging health and economic problem on dairy farms. J Vet Res. 2016; 60: 373–378.
9. Amhed F. Y, Application of phase-contrast microscope for detection of *Prototheca* spp. microalgae in tissue section-first record (Note). Egypt J Vet Sci. 2020; 51, 1: 89–91.
10. Smulski S. Rzadko spotykane czynniki etiologiczne mastitis u krów. Weterynaria w terenie. 2018; 1: 52–56.
11. Gregorczyk S, Bakuła Z, Krukowski H, et al. Nowa metoda identyfikacji *Prototheca* spp. wykorzystująca analizę PCR-RFLP genu 18S rDNA. Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski, 2014.
12. Roeske K, Dulko E, Jagielski T. Typowanie glonów *Prototheca* spp. techniką High Resolution Melting Real-Time PCR. Post Mikrobiol. 2019; 58, 1: 76.
13. Zeng X, Kudinha T, Kong F, et al. Comparative genome and transcriptome study of the gene expression difference between pathogenic and environmental strains of *Prototheca zopfii*. Front Microbiol. 2019; 10, 443: 1–14.
14. Murugaiyan J, Ahrrholdt J, Kowbel V, et al. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. Clin Microbiol Infect. 2012; 18, 5: 461–467.
15. Masuda M, Hirose N, Ishikawa T, et al. *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis. Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66: 1510–1520.
16. Zhao F, Chen M, Fu Y. Multiple cutaneous infections caused by *Prototheca wickerhamii*. J Clin Lab Anal. 2020; 34(11): 1–4.
17. Jagielski T, Gawor J, Bakuła Z, et al. cytb as a new genetic marker for differentiation of *Prototheca* species. J Clin Microbiol. 2018; 56(10): e00584–18.
18. Solky A C, Laver N M, Williams J, et al. *Prototheca wickerhamii* infection of a corneal graft. Cornea. 2011; 30, 10: 1173–1175.
19. Godofredo Romero V, Enokihara MM, Tomimori J, et al. Cutaneous protothecosis in kidney transplant recipient. An Bras Dermatol. 2020; 95(2): 210–213.
20. Satoh K, Ooe K, Nagayama H, et al. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60: 1236–1240.
21. Minato K, Yoshikawa M, Nakanishi H, et al. Long Term Follow-Up of *Prototheca keratitis*. Int Medical Case Rep J. 2020; 13: 503–506.
22. Seok J Y, Lee Y, Lee H, et al. Human Cutaneous Protothecosis: Report of a case and literature review. Korean J Pathol. 2013; 47: 575–578.
23. Nguyen Ly Q G, Rosen T. Cutaneous protothecosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia: A case report and literature review. J Fungi. 2015; 1: 4–12.
24. Kazantseva IA, Molochkov AV, Sukhov AV, et al. A case of cutaneous protothecosis. Arkh Patol. 2017; 1: 52–55.
25. Rajan A, Pai V V, Shukla P. Cutaneous protothecosis in an immunocompetent host. Indian J. Dermatol. Venereol Leprol. 2020; 86: 414–417.
26. Yagnik K, Bossé R, Reppucci J, et al. Case Report: Olecranon bursitis due to *Prototheca wickerhamii* in an immunocompromised patient. Am J Trop Med Hyg. 2019; 100, 3: 703–705.
27. Zhang Q Q, Zhu L P, Weng X H, et al. Meningitis due to *Prototheca wickerhamii*: rare case in China. Med Mycol. 2007; 45: 85–88.
28. Żak I, Jagielski T, Kwiatkowski S, et al. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus.

- First case of human protothecosis in Poland. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(2): 186–189.
29. Yi Sim J. Fatal disseminated infection caused by *Prototheca zopfii* in a child with leukemia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019; 52: 833–835.
  30. Joerger T, Suliman S, Carson VJ, et al. Chronic meningitis due to *Prototheca zopfii* in an adolescent girl. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2021; 10(3): 370–372.
  31. El Hoshy K, Abdel-Halim MRE, El Nabarawy E, et al. Cutaneous protothecosis as an unusual complication following dermal filler injection: A case report. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2019; 12(12): 13–16.
  32. Jagielski T, Dyląg M, Roesler U, et al. Isolation of infectious microalga *Prototheca wickerhamii* from a carp (*Cyprinus carpio*) – a first confirmed case report of protothecosis in a fish. *J Fish Dis.* 2017; 40(10): 1417–1421.
  33. Schöniger S, Roschanski N, Rösler U, et al. *Prototheca* species and *Pithomyces chartarum* as causative agents of rhinitis and/or sinusitis in horses. *J Comp Pathol.* 2016; 155: 121–125.
  34. Sapieryński R, Jońska I, Ostrzeszewicz M. Obraz morfologiczny zapalenia nerek u zwierząt. *Życie Wet.* 2018; 93(10): 700–711.
  35. Whipple KM, Wellehan JF, Jeon AB, et al. Cytologic, histologic, microbiologic, and electron microscopic characterization of a canine *Prototheca wickerhamii* infection. *Vet Clin Pathol.* 2020; 49: 326–332.
  36. Huth N, Wenkel RF, Roschanski N, et al. *Prototheca zopfii* genotype 2-induced nasal dermatitis in a cat. *J Comp Pathol.* 2015; 152(4): 287–290.
  37. Macedo J TSA, Riet-Correa F, Dantas AFM, et al. Cutaneous and nasal protothecosis in a goat. *Vet Pathol.* 2008; 45: 352–354.
  38. Malinowski E, Lassa H, Kłossowska A. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2002; 46: 295–299.
  39. Bakula Z, Ratajczyk A, Krukowski H, et al. Identyfikacja szczepów *Prototheca* izolowanych z przypadków mastitis od krów mlecznych z terenu Polski. Uniwersytet Warszawski, 2014.
  40. Jagielski T, Buzzini P, Lassa H, et al. Multicentre Etest evaluation of in vitro activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 1945–1947.
  41. Wawron W, Bochniarz M, Piech T, et al. Outbreak of protothecal mastitis in a herd of dairy cows in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2013; 57: 335–339.
  42. Tyczkowska-Sieron E, Markiewicz J, Grzesiak B, et al. Cold atmospheric plasma inactivation of *Prototheca zopfii* isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 2018; 10: 118–122.
  43. Jagielski T, Roeske K, Bakula Z, et al. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *J Dairy Sci.* 2019; 102: 619–628.
  44. Shahid M, Cobo ER, Chen L, et al. *Prototheca zopfii* genotype II induces mitochondrial apoptosis in models of bovine mastitis. *Sci Rep.* 2020; 10, 698: 1–10.
  45. Shahid M, Cavalcante PA, Knight CG, et al. Murine and human cathelicidins contribute differently to hallmarks of mastitis induced by pathogenic *Prototheca bovis* glonae. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 31.
  46. Kwieciński J. Biofilm formation by pathogenic *Prototheca* glonae. *Lett Appl Microbiol.* 2015; 61: 511–517.
  47. Jagielski T, Krukowski H, Bochniarz M, et al. Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Microb Biotechnol.* 2019; 12(3): 556–566.
  48. Grzesiak B, Krukowski H, Bis-Wencel H, et al. Wstępna ocena właściwości bójczych ekstraktu glicerynowo-wodnego z korzenia mydlnicy lekarskiej na szczepy glonów *Prototheca zopfii*. *Post Mikrobiol. Supplement.* 2019; 58(1): 112.