

\*Robert Tomasz Kuthan<sup>1</sup>, Mirosław Łuczak<sup>1,2</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>1,2</sup>

## Wytwarzanie biofilmu przez metycylino-oporne szczepy *Staphylococcus aureus*

### Biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus Centrum Leczenia Obrażeń w Warszawie  
Kierownik Zakładu: dr n. przyr. Anna Sawicka-Grzelak

<sup>2</sup>Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej  
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk

#### Streszczenie

**Wstęp.** Jednym z najczęstszych czynników zakażeń skóry i tkanek miękkich są szczepy *Staphylococcus aureus*. Wśród nich najbardziej niebezpieczne i trudne w procesie terapii pacjentów są szczepy metycylino-oporne (MRSA). Właściwości chorobotwórcze bakterii w ostatnich latach są kojarzone ze zdolnością do wytwarzania biofilmu. Biofilm to przytwierdzona do powierzchni ustrukturowana społeczność komórek bakteryjnych, wykazująca cechy fenotypowe różne od komórek występujących w formie planktonicznej. Biofilm między innymi może mieć wpływ na utrzymywanie się stanu zapalnego i utrudnienie gojenia ran.

**Materiały i metody.** Badania przeprowadzono na 34 szczepach MRSA izolowanych w latach 2005-2008 z wymazów skóry, treści ropnej i przedsionka nosa. Identyfikację szczepów i badanie ich lekowrażliwości przeprowadzono przy użyciu analizatorów mikrobiologicznych ATB Expression System oraz Vitek2 (bioMérieux).

Zbadano zdolność wytwarzania biofilmu metodą kolorymetryczną oraz określono częstotliwość występowania 6 genów: *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnB*, *icaA*, *cna*.

**Wyniki.** Badania techniką PCR wykazały duże zróżnicowanie w częstotliwości występowania badanych genów. Wyróżniono 12 genotypów, w obrębie których dominował genotyp G0 – obecność wszystkich badanych genów.

W badaniach nad wytwarzanie biofilmu stwierdzono, że 35,3% szczepów wykazywało słabą, 61,8% średnią i 2,9% dużą zdolność do wytwarzania biofilmu. Nie stwierdzono występowania szczepów o bardzo dużej zdolności do wytwarzania biofilmu.

**Wnioski.** 1. Stwierdzono, że wszystkie badane szczepy MRSA posiadały zdolność do tworzenia biofilmu. 2. Większość badanych szczepów odpowiedzialnych za zakażenia skóry i tkanek miękkich posiadała komplet lub prawie komplet badanych genów. 3. Występowanie genów odpowiedzialnych za adhezję i ich układ nie korelowały ze zdolnością do wytwarzania biofilmu i ilością wytworzonej w nim biomasy. 4. Szczepy posiadające gen *icaA* – odpowiedzialny za syntezę PIA, nie wytwarzały większej biomasy w biofilmie od szczepów, które tego genu nie posiadały.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, metycylino-oporność, biofilm

#### S u m m a r y

**Introduction.** One of the most common agents responsible for nosocomial and community-acquired infections is *Staphylococcus aureus*. Among *S. aureus* strains the most dangerous and difficult in the process of patient's therapy are methicillin-resistant (MRSA). In recent years pathogenicity of bacteria are believed to be connected with its ability to form biofilm. Biofilm is a bacterial community attached to the surface. Bacteria present in this structure show different phenotypic character from planktonic ones, and may contribute to prolongation of inflammation and to hindering of the wound healing. The aim of the study was to determine the presence of chosen pathogenicity genes in the MRSA infecting skin and soft tissues as well as the potency of biofilm formation by these strains.

**Material and methods.** In the experiments the uniform group of 34 MRSA strains were used, all isolated in 2005-2008 from skin swabs. All investigated strains were examined for the presence of the following genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnB*, *icaA*, *cna*. The PCR-technique was performed. Biofilm formation was examined by the use of microtiter plate assay and colorimetric method.

**Results.** PCR analysis revealed a wide variety of the occurrence of the tested genes. 12 genotypes were identified within which the genotype G0, with the presence of all investigated the genes – were dominant. 35.3% of the tested strains expressed weak ability to produce biofilm, 61.8% of the strains were medium biofilm producers and only 2.9% of the strains were strong biofilm producers. None of the strains expressed very strong ability to produce biofilm.

**Conclusions.** 1. All of the tested MRSA were able to form biofilm. 2. In most of the examined strains responsible for skin and soft tissue infection all or almost all of the tested genes were present. 3. Occurrence and configuration of the investigated genes did not correlate with the ability to biofilm formation and with the amount of biomass in the biofilm structure. 4. *icaA* positive strains, which is responsible for PIA synthesis, did not form higher amount of biomass than *icaA* negative strains.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistance, biofilm

## WSTĘP

### Biofilm bakteryjny

Biofilm bakteryjny definiowany jest jako ustrukturyzowana społeczność komórek bakteryjnych unieruchomionych w biopolimerowej macierzy zewnątrzkomórkowej wytwarzanej przez te komórki. Biofilm jest na trwałe przytwierdzony do podłoża, na którym wzrasta, może być nim materia nieożywiona jak również tkanki organizmu. Występowanie w formie biofilmu pozwala bakteriom na zasiedlanie różnych nisz ekologicznych, a także w wielu przypadkach przetrwanie w niesprzyjających dla pojedynczych komórek warunkach. W środowisku naturalnym ponad 99% bakterii występuje w formie biofilmu. W przyrodzie biofilm zazwyczaj tworzony jest przez kilka gatunków drobnoustrojów. Biofilm powstający na powierzchni materiałów medycznych, wprowadzanych do ciała pacjentów oraz na powierzchni zakażonych tkanek człowieka złożony jest głównie z jednego gatunku bakterii. W rozwoju biofilmu można wyróżnić kilka etapów: adhezję komórek do powierzchni, wytwarzanie mikrokoloni, dojrzewanie biofilmu i odrywanie się powierzchniowych fragmentów biofilmu i/lub pojedynczych planktonicznych komórek. W wyniku adhezji do powierzchni zachodzą istotne zmiany w metabolizmie komórki, polegające głównie na wzmożonej ekspresji genów kodujących wytwarzanie białek zewnątrzkomórkowych oraz substancji polisacharydowych wydzielanych pozakomórkowo (1, 2). Skutkiem tego jest unieruchomienie komórek w macierzy zewnątrzkomórkowej i umożliwienie dalszego kształtowania się biofilmu.

W toku kształtowania się przestrzennej, trójwymiarowej struktury biofilmu dochodzi do stopniowej jego polaryzacji. W wyniku tego procesu, po pewnym czasie można wyróżnić warstwę komórek położonych najbliżej powierzchni, na której powstał biofilm, warstwę środkową – w obrębie, której dochodzi do wytworzenia tzw. kanałów wodnych, umożliwiających swobodny przepływ substancji odżywczych, eliminację szkodliwych produktów metabolizmu, jak również przepływ cząsteczek sygnałnych zaangażowanych w quorum sensing (3, 4). Trzecia warstwa, to warstwa powierzchniowa biofilmu (najbardziej oddalona od podstawy biofilmu) złożona z komórek absorbujących substancje odżywcze ze środowiska. Jest ona jednocześnie najbardziej narażona na działanie różnego rodzaju czynników fizykochemicznych oddziałujących na biofilm, np. przepływ krwi, środki dezynfekcyjne, antybiotyki. Okresowo, z w pełni ukształtowanego biofilmu, z

jego części powierzchniowej uwalniane są pojedyncze komórki, a niekiedy nawet większe skupiska komórek. W wyniku przemieszczenia, np. z prądem krwi, mogą one osiedlić się w nowej lokalizacji i dać początek nowemu biofilmowi.

### Biologia biofilmu gronkowcowego

**Kluczowe elementy rozwoju biofilmu gronkowcowego są identyczne jak w przypadku innych bakterii.** W czasie powstawania i dojrzewania biofilmu zachodzi wiele zmian fizjologicznych w komórkach *Staphylococcus aureus*, nieobserwowanych w przypadku komórek „wolno żyjących”. Pierwszym etapem jest synteza licznych bakteryjnych powierzchniowych substancji rozpoznających adhezyjne molekule macierzy (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* – MSCRAMMs), które wykazują powinowactwo m.in. do fibronektyny oraz fibrynogeny. Adhezyny warunkują kowalencyjne i niekowalencyjne przyłączanie komórek do powierzchni, na której powstaje biofilm. Faza przyłączania się komórek do powierzchni jest pierwszym i kluczowym etapem tworzenia i dalszego rozwoju biofilmu. *S. aureus* podobnie jak *Staphylococcus epidermidis* wytwarza liczne MSCRAMM, które wykazują zdolność do wiązania się z licznymi białkami człowieka, np. fibrynogenem, fibronektyną i innymi. Ekspresja MSCRAMM jest nasiloną głównie w początkowym etapie tworzenia biofilmu, gdy gęstość komórek jest niewielka. W miarę wzrostu liczby komórek, na drodze *quorum sensing*, ekspresją MSCRAMM ulega obniżeniu w wyniku działania systemu agr. Po wstępnej fazie przyłączania się komórek *S. aureus* do powierzchni podłoża rozpoczyna się faza dojrzewania. Charakterystyczna dla tego etapu jest agregacja komórek, która jest osiągnięta dzięki różnym cząsteczkom, m.in. białkom adhezyjnym oraz polisacharydowym egzopolimerom. Spośród nich głównym czynnikiem jest polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa (PIA), będąca poli-*N*-acetyloglukozoaminą. Jest to częściowo deacylowany polimer *N*-acetyloglukozoaminy z wiązaniami  $\beta$ -1,6, który wraz z innymi polimerami, takimi jak kwasy tejchojowe i białka, tworzy główną, pozakomórkową macierz biofilmu gronkowcowego, zwaną także śluzem. Deacylowane obszary *N*-acetyloglukozaminy pełnią istotną rolę, gdyż nadają elektrododatniego charakteru cząsteczkom, które normalnie są obojętne. W konsekwencji sprzyja to elektrostatycznym oddziaływaniom pomiędzy ujemnie naładowanymi powierzchniami sąsiadujących bakterii. Ekspresja operonu *ica*

podlega regulacji przez liczne czynniki środowiskowe, m.in. stężenie tlenu (w warunkach anaerobowych synteza PIA ulega nasileniu) oraz czynniki autogenne jak białka regulatorowe. Jakkolwiek PIA odgrywa kluczową rolę w tworzeniu biofilmu, nie jest on niezbędnym czynnikiem do jego wytworzenia. Opisano biofilmotwórcze szczepy *S. aureus*, w których nie stwierdzono obecności genów operonu *ica*. Uważa się, że w przypadku tych szczepów, rolę PIA przejmują białka adhezyjne, wśród których istotną rolę odrywa produkt genu *sasG* (*Staphylococcus aureus surface protein G*), podobny do białka *Aap* (*accumulation-associated protein*) *S. epidermidis*, uczestniczącego w międzykomórkowej adhezji oraz akumulacji (5). Cucarella (6), w badaniach nad biofilmem wytwarzanym przez szczepy *S. aureus*, które były izolowane od krów z mastitis opisał inne białko zaangażowane w tworzenie biofilmu. Białkiem tym jest *Bap* (*biofilm-associated protein*). Homolog genu *bap* gen *bhp* stwierdzono w szczepach *S. epidermidis* izolowanych od ludzi. Jednocześnie homologię białka *Bap* stwierdzono u innych bakterii, co sugeruje, że rodzina tych białek może mieć istotne znaczenie w tworzeniu biofilmu (7). W międzykomórkowej akumulacji oraz rozwoju biofilmu, biorą także udział białka wiążące fibronektynę *FnBPA* oraz *FnBPB* (8). Dalsze etapy budowy wstępnie utworzonego biofilmu, obejmują kształtowanie się jego przestrzennej struktury. Przyjmuje się, że jego organizacja przebiega nieco odmiennie od stosunkowo dobrze scharakteryzowanej struktury biofilmu *P. aeruginosa*. Wspólną cechą przestrzennego kształtowania biofilmu jest udział cząsteczek zaangażowanych w *quorum sensing*, którymi w przypadku *P. aeruginosa* są surfaktanty – ramnolipidy, a u *S. aureus* peptydy, również o właściwościach surfaktantów. Kolejnym etapem rozwoju biofilmu jest jego rozprzestrzenianie. Jest on ściśle kontrolowany głównie przez system *agr* (9), na drodze *quorum sensing*, czego wynikiem jest utrzymanie właściwej grubości już utworzonego biofilmu oraz kolonizacja innych obszarów tkanek. Aktywność *agr* dotyczy głównie komórek w powierzchniowej warstwie biofilmu. W przypadku mutantów *agr*, które stanowią do 25% szczepów izolowanych z zakażeń związanych z obecnością biofilmu, obserwowano tworzenie grubszego i bardziej zwarteo biofilmu w stosunku do szczepów dzikich. Jednocześnie, *agr* wpływa także na poziom toksyny  $\delta$  o właściwościach surfaktantu. W wytworzonym biofilmie dochodzi także do obumierania części populacji komórek. Kontrolowana śmierć komórek bakteryjnych, jako proces analogiczny do apoptozy komórek eukariotycznych, jest przedmiotem licznych kontrowersji. Uważa się, że liza określonej puli komórek biofilmu jest istotna dla jego trwania. Proces autolizy bakterii jest regulowany m.in. przez *CidR* – regulator hydrolizy mureiny. W wyniku lizy komórek dochodzi do uwolnienia DNA. Uwolnione cząsteczki DNA są istotnym elementem strukturotwórczym biofilmu, ponieważ cząsteczka DNA jest polianionem, a tym samym wykazuje zdolność wiązania innych molekuł biofilmu, podobnie jak w przypadku kwasów tejchojowych

(10, 11). Spośród innych czynników wpływających na powstawanie biofilmu gronkowcowego należy wspomnieć o elementach insercyjnych zdolnych do integracji w wybrane obszary DNA. Szeroko rozpowszechniony element insercyjny IS256 może integrować do genów operonu *ica*, a tym samym upośledzać a nawet uniemożliwiać produkcję PIA (12, 13). W powstawanie i kształtowanie biofilmu, zaangażowane są także inne liczne geny i systemy regulatorowe, które w miarę postępu badań nad biofilmem gronkowcowym ukazują złożoność oraz wieloczynnikowość tego procesu. Badania Sambanthamoorthy (14) wykazały istotną rolę genu *msa* w tworzeniu biofilmu zarówno w warunkach *in-vitro* jak i *in-vivo*, na drodze modulacji ekspresji *sarA* (*staphylococcal accessory regulator*) – głównego globalnego regulatora, który wpływa na regulację ekspresji *alsS* – syntetazy  $\alpha$ -acetylacetyazy, *altA* – autolizyny oraz *icaA* (15). Szczepy *S. aureus* z mutacją w obrębie genu *msa* (*modulator of sarA*) wykazywały pięciokrotnie obniżoną transkrypcję genu *sarA*. W toku badań nad wytwarzaniem biofilmu przez szczep z mutacją w genie *msa* wykazano, że mutacja ta wpływa na tworzenie dojrzałego biofilmu, a nie wpływa na początkowy etap jego powstawania, tj. początkową adhezję do powierzchni. Jednocześnie wykazano, że mutanty w genie *msa* nie są zdolne do wiązania z fibrynogenem przy zachowanej zdolności łączenia się z fibronektyną. Jak wiadomo, wiązanie z fibronektyną przyczynia się do międzykomórkowej akumulacji komórek w biofilmie, co wykazały badania O'Neill i wsp. (16). Mutacja w genie *msa* wpływa istotnie także na ekspresję genu *arcA* kodującego deaminazę arginianową, będącą enzymem szlaku deaminacji argininy, wykorzystywanego do uzyskania energii w warunkach beztlenowych. W tworzenie biofilmu zaangażowane są także geny *tcaR* – będące regulatorem transkrypcji oraz *spxA* – mającego funkcję regulatora transkrypcji (17).

### Zmiany fizjologiczne w biofilmie – znaczenie dla chemoterapii

W wytworzonym biofilmie zachodzą również zmiany fizjologiczne reprezentowane przez obniżenie aktywności biosyntetycznej dotyczącej DNA, białek oraz ściany komórkowej, które są charakterystyczne głównie dla komórek wolno rosnących. Ponadto zachodzą zmiany w obrębie metabolizmu oddechowego, które związane są z niską zawartością tlenu – szczególnie w głębszych warstwach biofilmu – w wyniku czego uruchamiane są zastępczo różne fermentacyjne szlaki metaboliczno-oddechowe, np. fermentacji acetoiny. Niezmiernie istotne z medycznego punktu widzenia są zmiany fizjologiczne komórek tworzących biofilm prowadzące do wzrostu oporności na antybiotyki i substancje biobójcze biofilmu. Głównymi czynnikami ograniczającymi oddziaływanie wspomnianych substancji na komórki tworzące biofilm są: ograniczenie przez macierz biofilmu dyfuzji substancji biobójczych do komórek bakterii, zmiany w przebiegu i nasileniu

procesów metabolicznych, których celem działania są antybiotyki, występowanie subpopulacji opornych na działanie leków przeciwbakteryjnych.

### Rola biofilmu w zakażeniach ran i tkanek miękkich

W wyniku przerwania ciągłości tkanek, np. podczas zranienia rozpoczynają się procesy gojenia, w przebiegu których wyróżnić można fazy: zapalną, proliferacji i remodelowania (18). Liczne czynniki mogą zaburzyć prawidłowy proces gojenia. Zalicza się do nich m.in. obecność choroby podstawowej, niedożywienie, a także zakażenia bakteryjne. W zakażeniach ran dominującą rolę ogrywają bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, głównie *P. aeruginosa* oraz z rodzaju *Staphylococcus*, głównie *S. aureus* (19), ale także *S. epidermidis* i inne gronkowce koagulazo-ujemne. W przypadkach upośledzenia funkcji odpornościowych organizmu, obronna faza zapalna może nie być wystarczająco skuteczna dla eliminacji drobnoustrojów. W takich przypadkach następuje szybki rozwój bakterii, a także wytwarzanie przez nie biofilmu. Wytworzony w ranie biofilm, nie tylko nie jest skutecznie zwalczany przez siły obronne organizmu, ale także wykazuje zwiększoną oporność na działanie antybiotyków i antyseptyków. Przyczynia się to do rozwoju zakażenia przewlekłego i utrudnionego gojenia rany, ze względu na stale utrzymujący się stan zapalny. Według szacunków Narodowego Instytutu Zdrowia w Wielkiej Brytanii, 80% przewlekłych zakażeń związanych jest z powstaniem biofilmu (20).

### CEL PRACY

**Ocena zdolności do wytwarzania biofilmu przez metycyliny-oporne szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA) hodowane z zakażeń ran, skóry i tkanek miękkich. Ponadto określenie częstotliwości występowania wybranych genów zaangażowanych w proces adhezji i potencjalnie warunkujących wytwarzanie biofilmu.**

### MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. 34 szczepy MRSA wyhodowane z wymazów z rani i owrzodzeń ( $n = 31$ ), aspiratów treści ropnej ( $n = 2$ ), przedsionek nosa ( $n = 1$ ) (badanie w kierunku nosicielstwa szczepów MRSA), które badano w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus Centrum Leczenia Obrażeń w Warszawie w okresie od czerwca 2005 roku do lutego 2008 roku.

Hodowle bakterii prowadzono przy zastosowaniu standardowych metod mikrobiologicznych. Wrażliwość na metycylinę określono wg zaleceń KORLD (39) metodą dyfuzyjno-krążkową z zastosowaniem krążków antybiogramowych z cefoksytiną 30  $\mu\text{g}$  (Oxoid, Anglia).

Identyfikację drobnoustrojów przeprowadzono przy użyciu testów ID 32 Staph kart GP do identyfikacji bak-

terii Gram-dodatnich oraz testu aglutynacji lateksowej Staph Slide Kit oraz aparatów: ATB Expression System i analizatora bakteriologicznego Vitek 2. Wszystkie testy były produkcji bioMérieux, Francja. Ocena zdolności wytwarzania biofilmu przeprowadzono przy zastosowaniu 96 studzienkowych, mikrotitracyjnych płytek polistyrenowych, do których dodawano 190  $\mu\text{l}$  pożywki TSB i inokulowano 10  $\mu\text{l}$  18-godzinnej hodowli bakteryjnej prowadzonej na pożywce TSB. Płytki inkubowano przez 48 godzin, przepłukiwano jałowym roztworem soli, osuszano w czasie 2 godzin w temperaturze 37°C i wybarwiano roztworem fioletu krystalicznego. Zaadsorbowany przez biofilm barwnik ekstrahowano 96% alkoholem etylowym. Ekstrakt fioletu krystalicznego przenoszono do nowej płytki i dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , spektrofotometr z filtrem  $\lambda = 595 \text{ nm}$  (Dynex Technology, USA), wartość tła oznaczono wobec próby odczynnikowej. Szczepy wykazujące absorbancję od 0,100 do 0,299 określono jako „+” (słaba zdolność do wytwarzania biofilmu), w przedziale od 0,300 do 0,499 określono jako „++” (średnia zdolność do wytwarzania biofilmu), w przedziale od 0,500 do 0,699 określono jako „+++” (duża zdolność do wytwarzania biofilmu) i powyżej 0,700 określono jako „++++” (bardzo duża zdolność do wytwarzania biofilmu).

Wykrywanie obecności genów: *icaA* – kodujący poliasacharydową adhezynę międzykomórkową, *fnbA* – kodujący A białko wiążące fibronektynę, *fnbB* – kodujący białko B wiążące fibronektynę, *clfA* – kodujący białko A wiążące fibrynogen (clumping factor A), *clfB* – kodujący białko B wiążące fibrynogen (clumping factor B), *cna* – kodujący białko wiążące kolagen przeprowadzono z zastosowaniem techniki PCR. Wykorzystano sekwencje starterów oraz warunki reakcji opisane przez Ando i wsp. (21, 22).

### WYNIKI

Wyniki uzyskane przy użyciu techniki PCR wykazały, że wśród badanych szczepów można było wyróżnić 12 wzorów genowych, które nazwano od G0 do G11 (tab. 1). Dominował genotyp G0, zawierający wszystkie badane geny, który zidentyfikowano wśród 14 szczepów oraz G4, u którego występował brak genu *icaA*, zidentyfikowany u 7 szczepów. Występowanie genów *clfA* oraz *icaA* stwierdzono u 73,5% badanych szczepów, genu *cna* u 85,3% szczepów, genów *clfB* i *fnbB* u 91,2% szczepów, a genu *fnbA* u 94,1%.

Zbadano zdolność do wytwarzania biofilmu przez szczepy MRSA przy użyciu metody spektrofotometrycznej.

Stwierdzono, że wśród badanych szczepów 35,3% szczepów wykazywało słabą, 61,8% średnią i 2,9% dużą zdolność do wytwarzania biofilmu. Nie stwierdzono występowania szczepów o bardzo dużej zdolności do wytwarzania biofilmu. Najniższą zdolność do wytwarzania biofilmu wykazywały szczepy izolowane z aspiratów treści ropnej oraz przedsionka nosa, dla tych szczepów uzyskano wartości absorbancji wyno-

Tabela 1. Genotypy szczepów MRSA.

Symbol	Wzór genowy	Liczba szczepów (%)	Numer szczepu
G0:	<i>clfA</i> <sup>+</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	14 (41,2)	2, 3, 4, 5, 8, 9, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 25
G1:	<i>clfA</i> <sup>+</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>-</sup>	3 (8,8)	18, 19, 34
G2:	<i>clfA</i> <sup>+</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>-</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	1 (2,9)	28
G3:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	2 (5,9)	24, 32
G4:	<i>clfA</i> <sup>+</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>-</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	7 (20,6)	6, 7, 10, 11, 12, 15, 21
G5:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>-</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	1 (2,9)	26
G6:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>-</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>-</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>-</sup>	1 (2,9)	1
G7:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>-</sup> , <i>fnbB</i> <sup>-</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	1 (2,9)	27
G8:	<i>clfA</i> <sup>+</sup> , <i>clfB</i> <sup>-</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	1 (2,9)	29
G9:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>-</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	1 (2,9)	30
G10:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>-</sup> , <i>cna</i> <sup>+</sup>	1 (2,9)	31
G11:	<i>clfA</i> <sup>-</sup> , <i>clfB</i> <sup>+</sup> , <i>fnbA</i> <sup>+</sup> , <i>fnbB</i> <sup>+</sup> , <i>icaA</i> <sup>+</sup> , <i>cna</i> <sup>-</sup>	1 (2,9)	33

szące odpowiednio: 0,161; 0,178; 0,197. Analogiczne oznaczenia wykonano dla szczepów o genotypie G4, w przypadku którego nie stwierdzono występowania genu *icaA*. Stwierdzono, że w przypadku genotypu G4 28,6% szczepów wykazywało słabą, a 71,4% szczepów średnią zdolność do wytwarzania biofilmu. Wyniki badań przedstawiono na rycinie 1.

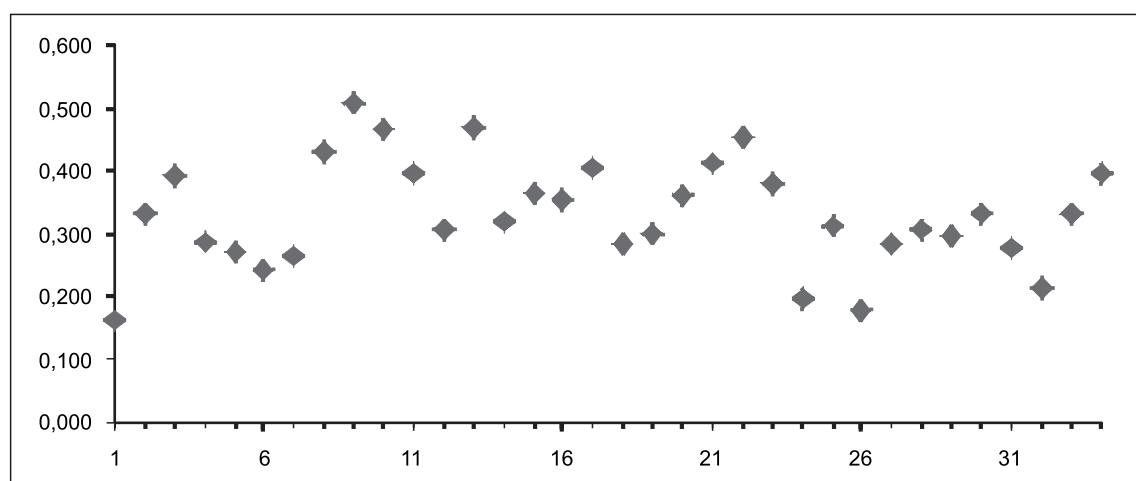
#### DYSKUSJA I WNIOSKI

**Narastający problem występowania zakażeń wywołanych przez szczepy MRSA związany jest w dużej mierze z wytwarzaniem przez nie biofilmu.** Ponadto wrażliwość na antybiotyki bakterii występujących w biofilmie, różni się od wrażliwości form planktonicznych często wzrostem wartości MIC przekraczającym ponad 100 razy maksymalną dawkę antybiotyku możliwą do zastosowania u pacjenta (23). **Stąd w przypadku obecności biofilmu bakteryjnego przeważnie obserwuje się brak skuteczności antybiotyków, bez równoległej interwencji chirurgicznej, polegającej na radykalnym oczyszczeniu miejsca zakażenia wraz z usunięciem przylegających tkanek,**

**a w przypadku wystąpienia biofilmu na powierzchni implantu lub cewnika jego usunięciu.** Badania nad biofilmem, w szczególności *in-vivo* są bardzo trudne, stąd najpowszechniej stosowaną metodą badania zdolności wytwarzania biofilmu przez bakterie jest metoda wykorzystująca polistyrenowe płytki do hodowli komórkowych. Metoda ta jest łatwa i powszechnie stosowana, jednakże niejednorodność w zakresie między innymi: rodzajów podłoży, stosowanych odczynników, metod pomiarowych i innych parametrów stwarza dużą trudność w ocenie analogicznych lub zbliżonych jakościowo i ilościowo wyników prezentowanych przez różnych autorów, czy też różne laboratoria lub placówki naukowe.

**Celem poznawczym pracy było również określenie częstotliwości występowania wybranych genów potencjalnie odgrywających rolę w procesie tworzenia biofilmu.** Podjęto również próbę oceny korelacji między występowaniem genu lub genów, a zdolnością do wytwarzania biofilmu.

W licznych badaniach wykazano, że gronkowcowe białka: wiążące kolagen, fibronektynę oraz fibrynogen



Ryc. 1. Wytwarzanie biofilmu. Oś Y: wartość absorbancji, oś X: numer szczepu.

oddziałują i wiążą się z istotnymi białkami macierzy międzykomórkowej na zewnątrz komórki zwierzęcej (24, 25, 26). Rolę wiązania powyższych białek w procesie patogenezy wykazano zarówno *in-vitro*, jak i w badaniach na modelach zwierzęcych. Białka Cna i FnbA odgrywają dużą rolę w kolonizacji tkanek podczas procesów chorobowych, takich jak np.: zapalenie rogówki, zapalenie kości, a także w zakażeniach związanych z implementacją ciała obcego. Białko ClfA odgrywa kluczową rolę w wiązaniu do fibryny oraz do fibrynogeny (27). W komórkach *S. aureus* białka adhezyjne, takie jak FnbA, FnbB, Cna, ClfA, ClfB występują wspólnie z innymi molekułami, obecnymi na powierzchni komórki bakteryjnej, np. PIA – polisacharydowa adhezyna zewnątrzkomórkowa lub białkiem Bap – związanym z procesem tworzenia biofilmu. Zdzalik i wsp. (28) przeprowadzili badania porównawcze na szczepach izolowanych od pacjentów hospitalizowanych (wymazy z powierzchni skóry, ran i zmian głębokich) oraz od pacjentów niehospitalizowanych (wymazy tylko z powierzchni skóry). Stwierdzili, że gen *fnbA* i *cna* występowały częściej w przypadkach ran u pacjentów hospitalizowanych. Wśród pacjentów hospitalizowanych gen *fnbA* występował w ranach i zmianach głębokich u 50,0% szczepów, a gen *cna* u 72,5% szczepów. Campbell i wsp. (29) w badaniach porównawczych na szczepach MSSA i MRSA (n = 12 MSSA z Ameryki, 34 MSSA z Afryki Południowej i 44 MRSA z Ameryki) izolowanych od pacjentów z powikłanymi zakażeniami skóry i tkanek podskórnych stwierdzili, że wśród szczepów MSSA nie było istotnych różnic w częstotliwości występowania genów *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *icaA*. Natomiast odnotowano różnicę w odsetku występowania genu *cna* – 91,0% u pacjentów z Afryki i 75,0% z Ame-

ryki. W tych samych badaniach oceniono występowanie wyżej wymienionych genów w szczepach MRSA pochodzących tylko z Ameryki. Stwierdzono, że geny *clfA*, *clfB* i *icaA* występowały u wszystkich badanych szczepów, gen *fnbB* wykazano u 98,0% i gen *cna* u 55,0% szczepów. Ci sami autorzy wykonywali badania na dużej liczbie szczepów MRSA pochodzących z 21 krajów (522 szczepy) z sześciu kontynentów. Stwierdzili występowanie genu *fnbA* w 90,2%, *clfA* w 99,8%, *clfB* 94,6%, *fnbB* 95,2%, *icaA* 96,9% i *cna* w 6,5% badanych szczepów (30). Inni badacze (31) w badaniach nad CA-MRSA stwierdzili występowanie genu *fnbA* u 16,7% szczepów, a *fnbB* u 2,8% szczepów. Jednoczesne występowanie obu genów stwierdzono w 2,8% przypadków. Powyżej przytoczone wyniki badań, mimo że nie pozwalają na jednoznaczne skorelowanie konkretnych genów ze zdolnością bakterii do powodowania ropnych zakażeń skóry i ran, to jednak wskazują na prawdopodobny udział całego ich kompleksu.

## WNIOSKI

1. Stwierdzono, że wszystkie badane szczepy MRSA posiadały zdolność do tworzenia biofilmu.
2. Większość badanych szczepów odpowiedzialnych za zakażenia skóry i tkanek miękkich posiadała komplet lub prawie komplet badanych genów.
3. Występowanie genów odpowiedzialnych za adhezję i ich układ nie korelowały ze zdolnością do wytwarzania biofilmu i ilością wytworzonej w nim biomasy.
4. Szczepy posiadające gen *icaA*, odpowiedzialny za syntezę PIA, nie wytwarzały większej biomasy w biofilmie od szczepów, które tego genu nie posiadały.

## PIŚMIENNICTWO

1. Otto M: Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322: 207-28.
2. Patti J, Moore C, Justice A et al.: Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immunol* 2002; 70: 4987-96.
3. Kong K, Vuong C, Otto M: *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 133-39.
4. Yarwood J, Bartels D, Volper E et al.: Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004; 186: 1836-50.
5. Geoghegan J, Corrigan R, Gruszka D et al.: Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2010; 192: 5663-73.
6. Cucarella C, Solano C, Valle J et al.: Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183: 2888-96.
7. Tormo M, Úbeda C, Martí M et al.: Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 2007; 153: 1702-10.
8. Palma M, Haggar A, Flock J: Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 1999; 181: 2840-45.
9. Boles B, Horswill A: agr mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000052.
10. Huseby M, Kruse A, Digre J et al.: Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14407-412.
11. Tetz V, Tetz G: Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA Cell Biol* 2010; 29: 399-405.
12. Arciola C, Campoccia D, Gamberini S et al.: Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials* 2004; 25: 4117-25.
13. Hennig S, Nyunt Wai S, Ziebuhr W: Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 117-22.
14. Sambanthamoorthy K, Schwartz A, Nagarajan V et al.: The role of *msa* in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *BMC Microbiol* 2008; 8: 221-31.
15. Tormo M, Martí M, Valle J et al.: SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* 2005; 187: 2348-56.
16. O'Neill E, Pozzi C, Houston P et al.: A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnbPA and FnbPB. *J Bacteriol* 2008; 190: 3835-50.
17. Rohde H, Knobloch J, Horstkotte M et al.: Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADCB* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* 39: 4595-96.

18. Gurtner G, Werner S, Barrandon Y et al.: Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314-21.
19. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K et al.: Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 4084-89.
20. Rhoads D, Wolcott R, Cutting K et al.: [In:] *Biofilms: Coming of Age. Evidence of biofilms in wounds and potential ramifications.* Wielka Brytania, The Biofilm Club, Manchester University, 2007; [http://www.woundspecialist.com/images/Rhoads\\_et\\_al\\_%20BFC\\_2007.pdf](http://www.woundspecialist.com/images/Rhoads_et_al_%20BFC_2007.pdf)
21. Ando E, Monden K, Mitsuhashi R et al.: Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Med Okayama* 2004; 58: 207-14.
22. Nemat H, Hermans K, Devriese L et al.: Screening of genes adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from poultry. *Avian Pathol* 2009; 38: 513-7.
23. Bartoszewicz M, Secewicz A: Skuteczność wybranych antybiotyków i antyseptyków wobec MRSA w zakażonych ranach. *Zakażenia* 2007; 6: 89-93.
24. Arciola C, Campoccia D, Gamberini S et al.: Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 246: 81-6.
25. Dickinson R, Nagel J, McDevitt D et al.: Quantitative comparison of clumping factor and coagulase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface bound fibrinogen under flow. *Infect Immun* 1995; 63: 3143-50.
26. Patti J, Allen B, McGavin M: MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 585-617.
27. Hartford O, Wann E, Hook M et al.: Identification of residues in the *Staphylococcus aureus* fibrinogen-binding MSCRAMM clumping factor A (ClfA) that are important for ligand binding. *J Biol Chem* 2001; 276: 2466-73.
28. Zdżalik D, Dominiak A, Gałkowska H et al.: Charakterystyka molekularna szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* wyizolowanych z materiału klinicznego. *Med Dośw Mikrobiol* 2006; 58: 269-74.
29. Campbell S, Deshmukh H, Nelson C et al.: Genotypical characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 678-84.
30. Bae I, Tonthat G, Stryjewski M et al.: Presence of genes encoding the Panton-Valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3952-57.
31. Nejma B, Mastouri M, Frih S et al.: Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 21-26.

otrzymano/received: 18.08.2011

zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:

\*Robert Tomasz Kuthan  
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,  
Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus  
Centrum Leczenia Obrażeń w Warszawie  
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa  
tel.: (22) 502-19-22  
e-mail: rkuthan@yahoo.com