

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Ewa Szczuka

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

Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – mikrobiologii, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 2001r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Typowanie bakterii należących do rodzaju *Aeromonas*”.

Promotor: Prof. dr hab. Adam Kaznowski

Recenzenci: Prof. dr hab. Wanda Małek, Prof. dr hab. Adam Jaworski

Dyplom magistra biologii, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 1992r. Tytuł pracy magisterskiej: „Mechanizm hemolizy erytrocytów ludzkich, świńskich i wołowych wywołany digitoniną”.

Promotor: Prof. dr hab. Józef Bielawski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.10.2001 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

1.10.2000 - 30.09.2001; wykładowca w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

1.10.1992 - 30.09.2000; asystent w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4. Wskazanie 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:

Mechanizmy patogeniczności *Staphylococcus* spp. oraz wpływ leków przeciwbakteryjnych na biofilm tworzony przez gronkowce

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Szczuka E.**, Urbańska K., Pietryka M., Kaznowski A. 2013. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiologica*, 58, 47-52.

IF₂₀₁₃ – 1.145; IF_{5-letni} – 1.060; punktacja MNiSW – 15; liczba cytowań (wg Web of Science) – 11; wkład habilitanta - 75%, autor korespondencyjny.

2. **Szczuka E.**, Kaznowski A. 2014 Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampicin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiologica*, 59, 283-288.

IF₂₀₁₄ – 1; IF_{5-letni} – 1.009; punktacja MNiSW – 15; liczba cytowań (wg Web of Science) – 8; wkład habilitanta - 95%, autor korespondencyjny.

3. **Szczuka E.**, Telega K., Kaznowski A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiologica* 60, 1- 5.

IF₂₀₁₅ – 1.335; IF_{5-letni} – 1.168; punktacja MNiSW – 15; liczba cytowań (wg Web of Science) – 4; wkład habilitanta - 85%, autor korespondencyjny.

4. **Szczuka E.**, Grabska K., Kaznowski A. 2015. *In Vitro* Activity of rifampicin combined with daptomycin or tigecycline on *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Current Microbiology* 71, 184–189.
IF₂₀₁₅ – 1.519; IF_{5-letni} – 1.563; punktacja MNiSW – 15; liczba cytowań (wg Web of Science) – 2; wkład habilitanta - 85%, autor korespondencyjny.

5. **Szczuka E.**, Krzymińska S., Kaznowski A. 2016. Clonality, virulence and the occurrence of genes encoding antibiotic resistance among *Staphylococcus warneri* isolates from bloodstream infections. *Journal of Medical Microbiology* 65, 828-36.
IF₂₀₁₅ – 2.269; IF_{5-letni} – 2.458; punktacja MNiSW –20; liczba cytowań (wg Web of Science) – 0; wkład habilitanta - 80%, autor korespondencyjny.

6. **Szczuka E.**, Jabłońska L., Kaznowski A. 2016. Coagulase-negative staphylococci: pathogenesis, occurrence of antibiotic resistance genes and in vitro effects of antimicrobial agents on biofilm growing bacteria. *Journal of Medical Microbiology* 65, 1405-1413.
IF₂₀₁₅ – 2.269; IF_{5-letni} – 2.458; punktacja MNiSW – 20; liczba cytowań (wg Web of Science) – 0; wkład habilitanta: 80%, autor korespondencyjny.

7. **Szczuka E.**, Jabłońska L., Kaznowski A. 2017. Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* DOI 10.1099/mic.0.000453
IF₂₀₁₅ – 2.268; IF_{5-letni} – 2.879; punktacja MNiSW – 25; liczba cytowań (wg Web of Science) – 0; wkład habilitanta - 85%, autor korespondencyjny.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z 2016 r. i 2017 wykorzystano ostatnią dostępną wartość – IF₂₀₁₅) – **11.805**

Suma liczby punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, wg punktacji z 2015 r. – **125**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (wg bazy Web of Science) – 25

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Rodzaj *Staphylococcus* obejmuje 48 gatunków, które z uwagi na zdolność wytwarzania koagulazy zostały podzielone na gronkowce koagulazo-dodatnie i koagulazo-ujemne. *S. aureus*, gronkowiec koagulazo-dodatni, jest najlepiej poznanym i najistotniejszym z tego rodzaju gatunkiem chorobotwórczym dla człowieka. Dysponuje on szeregiem czynników wirulencji, które umożliwiają kolonizację i rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza, niszczenie komórek i tkanek oraz unikanie mechanizmów obronnych gospodarza (Gould i wsp. 2012). Gronkowce koagulazo-ujemne charakteryzują się mniejszym potencjałem wirulencji niż *S. aureus*, a wiele z nich wchodzi w skład mikrobioty skóry i błon śluzowych człowieka. *S. epidermidis* jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń u hospitalizowanych pacjentów wywoływanych przez koagulazo-ujemne gronkowce, następnie pozycje zajmują *S. haemolyticus* i *S. hominis*. W ostatnich latach notuje się wzrost zakażeń u ludzi powodowanych przez *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. simulans* i *S. caprae*. Bakterie te mogą być czynnikiem etiologicznym zakażeń oportunistycznych człowieka, związanych ze stosowaniem biomateriałów. Powodują one zapalenie kości i stawów po wszczepieniu implantów ortopedycznych, odcewnikowe zakażenie krwi, infekcje sercowo-naczyniowe związane ze stosowaniem implantów naczyniowych, zapalenie wsierdza po wszczepieniu sztucznych zastawek serca oraz zakażenia ran pooperacyjnych (Becker i wsp. 2014). Co warto zaznaczyć, w ciągu ostatnich kilkunastu lat rola gronkowców koagulazo-ujemnych jako drobnoustrojów wywołujących zakażenia u ludzi znacznie wzrosła. Wiąże się to z rosnącą liczbą osób z obniżoną odpornością immunologiczną, poddawanych inwazyjnym zabiegom medycznym.

Szeroko udokumentowany jest udział biofilmów w zakażeniach związanych ze stosowaniem biomateriałów medycznych (Rohde i wsp. 2006). Bakterie żyjące w biofilmie, czyli wysoce zorganizowanej populacji mikroorganizmów, przylegającej do powierzchni i otoczonej macierzą zewnątrzkomórkową, są znacznie mniej wrażliwe na działanie leków przeciwbakteryjnych oraz mechanizmów obronnych ustroju gospodarza. Wytworzenie biofilmu uwarunkowane jest zdolnościami adhezyjnymi bakterii, które dzięki obecności

zewnątrzkomórkowych adhezyn z grupy MSCRAMM (*ang.* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) mają zdolność swoistego rozpoznawania i wiązania się z białkami ustroju. W kolejnym etapie tworzenia biofilmu dochodzi do proliferacji komórek bakteryjnych i kolonizacji powierzchni abiotycznej lub uszkodzonej tkanki oraz wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej (EPS, *ang.* extracellular polymeric substance), która otacza rozwijający się biofilm. Podczas fazy dojrzewania zachodzą zmiany w metabolizmie bakterii ze względu na zróżnicowaną dostępność do tlenu i substancji odżywczych oraz zmiany ekspresji genów, również tych warunkujących wirulencję bakterii. Biofilm może przejść w fazę dyspersji, polegającej na odrywaniu się pojedynczych komórek bakteryjnych lub ich agregatów od biofilmu, co może prowadzić do kolonizacji nowych powierzchni, rozprzestrzenienia się infekcji w organizmie, a w przypadku przedostania się bakterii do krwiobiegu prowadzić też może do infekcji ogólnoustrojowej. Proces formowania biofilmu jest kontrolowany przez „quorum sensing”, czyli system umożliwiającego komunikację międzykomórkową za pomocą cząstek sygnałowych, które uczestniczą w regulacji ekspresji genów (Otto 2008).

Komórki bakteryjne żyjące w biofilmie wykazują 100-1000 krotnie wyższą oporność na antybiotyki w porównaniu z siostrzanymi formami planktonowymi tych bakterii. Wynika to między innymi z funkcji ochronnej jaką pełni macierz zewnątrzkomórkowa, która ogranicza penetrację leków przeciwbakteryjnych do głębszych warstw biofilmu. Ponadto, składniki śluzu mogą wiązać niektóre antybiotyki, co prowadzi do inaktywacji leku. W biofilmie występują bakterie o zwolnionym metabolizmie, o spowolnionym tempie wzrostu, nie dzielące się, tym samym mniej podatne na działanie pewnych antybiotyków. Ponadto, w biofilmie niektóre subpopulacje bakterii mogą różnicować się do form zbliżonych do bakteryjnych spor, zwanych komórkami typu „persisters”, które tolerują działanie leku i są zdolne do odbudowania biofilmu po zakończeniu terapii antybiotykowej. Obniżona wrażliwość na działanie antybiotyków może wynikać z faktu nadekspresji błonowych pomp usuwających terapeutyk z komórki w biofilmie. Bliskość komórek bakteryjnych w biofilmie sprzyja horyzontalnemu transferowi DNA, co może skutkować nabywaniem genów kodujących oporność na antybiotyki. W związku z zagęszczeniem komórek w biofilmie występuje duże nagromadzenie enzymów inaktywujących. To sprawia, że mikroorganizmy, nawet jeśli są narażone na działanie antybiotyków, mają dużą szansę przeżycia w biofilmie, a zakażenia przebiegające z udziałem biofilmu są trudne do eradykacji i często przechodzą w stan przewlekły oraz nawracający (Jefferson i wsp. 2004).

Komórki bakteryjne znajdujące się w głębszych warstwach struktury biofilmu ze względu na zwolnioną lub ograniczoną penetrację antybiotyku w biomasę biofilmu są szczególnie narażone na działanie antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych (sub-MIC). Należy jednak zaznaczyć, że również bakterie w formie planktonowej mogą być pod wpływem działania antybiotyku w stężeniach sub-MIC, szczególnie w przypadku gdy stosowane są zbyt niskie dawki leku aby został osiągnięty efekt bakteriobójczy lub bakteriostatyczny (Davies i wsp. 2006). Dane literaturowe wskazują, że antybiotyki w stężeniach sub-MIC mogą modulować ekspresje wielu genów, w tym genów kodujących toksyny, enzymy lityczne, białka regulatorowe, adhezyny oraz inne białka powierzchniowe. Ponadto, antybiotyki w stężeniach sub-MIC mogą wpływać na powierzchnię komórki bakteryjnej, na jej hydrofobowość, oraz jak wspomniano powyżej, mogą indukować wytwarzanie białek powierzchniowych - adhezyn. To decyduje o stopniu adhezji do powierzchni abiotycznej, czy też tkanki gospodarza oraz wpływa na zdolność bakterii do agregacji między sobą, co z kolei wpływa na proces tworzenia biofilmu (Kaplan i wsp. 2011). Na przykład wykazano, że tigeocyklina w stężeniach subinhibicyjnych wywołuje spadek ekspresji genu *tst* kodującego toksynę zespołu wstrząsu toksycznego, co skutkuje obniżeniem produkcji tej toksyny (Smith i wsp. 2010). Również poziom ekspresji genu kodującego *pvl* (leukocydynę Panton-Valentine) ulega obniżeniu pod wpływem tigeocykliny w stężeniach sub-MIC, co prowadzi do zmian w wirulencji bakterii i niewątpliwie wpływa na przebieg procesu zakażenia (Otto i wsp. 2013).

Gronkowce przez długi okres uznawane były za patogeny zewnątrzkomórkowe, jednakże liczne badania wykazały, że *S. aureus* i *S. epidermidis* mają zdolność inwazji komórek nabłonkowych i śródbłonna oraz osteoblastów co, chroni je przed mechanizmami obronnymi organizmu gospodarza. Bakterie te mogą bytować we wnętrzu tych komórek w mniej aktywnej metabolicznie formie zwanej SCV (*ang.* small colony variants) (Garzoni i wsp. 2009). Interesujące jest jednak to, że inwazja bakterii *S. epidermidis* do osteoblastów była na niskim poziomie, co wskazuje, że nie jest to główny patomechanizm zakażenia kości i szpiku (Valour i wsp. 2013). Do czynników wirulencji, którymi dysponują gronkowce należy zaliczyć toksyny. *S. aureus* wytwarza toksynę zespołu wstrząsu toksycznego, eksfoliatyny, enterotoksyny, hemolizyny: α , β , δ i γ oraz leukocydynę Panton-Valentine. U wielu gatunków gronkowców stwierdzono obecność genów determinujących wytwarzanie enterotoksyn (Gould i wsp. 2012). Hemolizyny wytwarzane są przez bakterie z gatunków *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. simulans* i *S. intermedius*. Natomiast *S. epidermidis* produkuje toksyny

należące do rodziny toksyn typu modulin rozpuszczalnych w fenolu (*ang.* phenol-soluble modulins, PSMs). Wbudowują się one w strukturę błon komórkowych, gdzie tworzą pory, co prowadzi do lizy erytrocytów i leukocytów. Ponadto, PSMs uczestniczą w procesie formowania dojrzałego biofilmu poprzez ich zaangażowanie w tworzenie "kanałów wodnych" w strukturze biofilmu oraz jego dyspersję (Otto 2012).

Podjęte badania miały na celu określenie mechanizmów patogeniczności bakterii z gatunków *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. simulans* i *S. caprae*. Udział tych bakterii w zakażeniach jest szeroko udokumentowany, natomiast mechanizmy patogeniczności wielu gatunków gronkowców nie zostały w pełni poznane. Gronkowce są mikroorganizmami najczęściej izolowanymi z biomateriałów medycznych. Stanowią one potencjalną powierzchnię do adhezji, kolonizacji i namnażania bakterii, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju biofilmu. W związku z powyższym badania skoncentrowały się na ocenie zdolności tworzenia biofilmu *in vitro* przez poszczególne gatunki gronkowców, poznaniu ich przestrzennej, trójwymiarowej struktury oraz ustaleniu genetycznego uwarunkowania tego procesu. W ramach prowadzonych badań oceniono zdolności adhezyjne i inwazyjne bakterii *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. simulans* i *S. caprae* w stosunku do komórek HeLa. Oceniono również ich właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek eukariotycznych. Kolejnym celem pracy była ocena skuteczności działania wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków na biofilm bakteryjny. Generowanie stężeń subinhibicyjnych leków w biofilmie skłoniło nas do oceny ich wpływu na ekspresję genów związanych z tworzeniem biofilmu oraz jego strukturę.

**Mechanizmy patogeniczności bakterii z gatunku *S. aureus*, *S. epidermidis*,
S. haemolyticus, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*,
S. simulans i *S. caprae*.**

Spośród 80 analizowanych szczepów *S. aureus*, 74 wykazywały zdolność adhezji do powierzchni polistyrenowej i tworzenia biofilmu *in vitro*. Co ważne, wszystkie szczepy były odporne na antybiotyki β -laktamowe, co potwierdzono obecnością genu *mecA*. U większości klinicznych szczepów MRSA (*ang.* methicillin-resistant *S. aureus*) stwierdzono występowanie genów *clfA* (99%), *clfB* (98%), *fib* (70%) kodujących białka wiążące

fibrynogen. Gen *fnbB* kodujący białka wiążące się z fibronektyną B wykryto u 50% szczepów, natomiast u żadnego izolatu nie stwierdzono obecności genu *fnbA* kodującego fibronektyną A. Gen *eno* kodujący białko wiążące lamininę występował u 71%, gen *cna* kodujący białko wiążące kolagen u 45%, a gen *ebp* kodujący białko wiążące elastynę jedynie u 15% MRSA. Natomiast u żadnego z izolatów nie stwierdzono obecności genów *bbp* kodujących białko wiążące sialoproteinę kości. Uzyskane wyniki wskazują, że *S. aureus* dysponuje szeregiem adhezyn wiążących fibrynogen, fibronektynę, lamininę, kolagen oraz elastynę, które umożliwiają wiązanie się do tkanek gospodarza, inicjowanie kolonizacji, co zapoczątkowuje proces tworzenia biofilmu (Szczuka i wsp. 2013).

Większość szczepów *S. aureus* (76%) tworzyło strukturę biofilmu w oparciu o mechanizmy zależne od operonu *icaADBC*, kodującego adhezynę PIA, która jest zbudowana z reszt N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniem glikozydowym β -1,6 i jest odpowiedzialna za kumulację komórek bakteryjnych w biofilmie. Natomiast u żadnego z badanych szczepów nie wykryto genów kodujących białko BAP (*ang. biofilm associated protein*). Co istotne, 23% szczepów było zdolnych do tworzenia biofilmu, pomimo że nie stwierdzono w ich genomach obecności genów *icaA*. U dziewięciu *ica*-negatywnych szczepów, stwierdzono obecność genów kodujących fibronektynę B, która jest zaangażowana w agregację komórek bakteryjnych w biofilmie. Jednakże, dziewięć szczepów tworzyło biofilm pomimo braku genów *icaA*, *bap*, *fnbB*, co świadczy o udziale w tym procesie jeszcze innych mechanizmów. Uzyskane wyniki wskazują, że w proces tworzenia biofilmu u *S. aureus* mogą być zaangażowane białka powierzchniowe pełniące rolę mediatorów interakcji międzykomórkowych, struktury wchodzące w skład ściany komórkowej - kwasy tejchojowe i lipotejchojowe oraz zewnątrzkomórkowe DNA, zapewniające integralność i stabilność struktury biofilmu.

Większość szczepów klinicznych *S. aureus* tworzy biofilm kodowany przez operon *icaADBC*, ale jego występowanie nie jest niezbędne w procesie tworzenia tych struktur. Analiza obrazów w mikroskopii konfokalnej wykazała, że biofilm tworzony przez szczepy *ica*-negatywne odznaczał się niższą biomasą, wysokością, mniejszą spistością struktury i nie kolonizował całej powierzchni komory, w porównaniu z biofilmem tworzonym przez szczepy *ica*-pozytywne (Szczuka i wsp. 2013).

Dystrybucja genów zaangażowanych w tworzenie biofilmu nie była związana z poszczególnymi klonami MRSA. Stwierdzono wysoką różnorodność genetyczną szczepów MRSA, brak genotypu dominującego charakteryzującego się podwyższonym potencjałem

chorobotwórczym. Analiza klonalna została przeprowadzona w oparciu o metodę VNTR, czyli metodę analizującą obecność zmiennej liczby krótkich tandemowych sekwencji powtórzonych w genach *clfA*, *clfB* kodujących odpowiednio clumping factor A i B, genie *spa* kodującym białko powierzchniowe A, genie *sspsA* kodującym proteinazę serynową V8, oraz locus *sdr* zawierających geny białek powierzchniowych *sdrC*, *sdrD*, i *sdrE* (Szczuka i wsp. 2013).

W kolejnym etapie badań analizie poddano 80 metycylooopornych szczepów *S. epidermidis* (Szczuka i wsp. 2014). Większość z nich (94%) wykazywała adhezję do abiotycznej powierzchni mikrocząstek hodowlanych oraz zdolność tworzenia biofilmu *in vitro*. Geny *icaA* wykryto u wszystkich izolatów tworzących biofilm, w przeciwieństwie do genów kodujących białko Aap (*ang.* accumulation-associated protein), których obecność stwierdzano u 85% szczepów klinicznych, gen kodujący białko Bhp (*ang.* cell wall-associated protein) występował u 29%. Co ważne, białka Aap i Bhp umożliwiają powstanie i dojrzewanie biofilmu przy braku adhezyny PIA. Ponieważ geny *aap* i *bph* wykryto jedynie u szczepów *ica*-pozytywnych, tym samym nie wykryto szczepów tworzących biofilm zależny jedynie od adhezyn białkowych. U wszystkich izolatów *S. epidermidis* zidentyfikowano geny kodujące adhezynę bakteryjną mające zdolność wiązania fibrynogenu, a u 89% adhezynę wiążącą fibronektynę. Obecność genu kodującego autolizynę AtlE stwierdzono u 90% izolatów. Autolizyna ta odgrywa kluczową rolę w adhezji, ponieważ inicjuje pierwszy etap wiązania komórek bakteryjnych do powierzchni polistyrenowej oraz ma zdolność wiązania witronektyny (Otto 2012). Powszechne występowanie genów kodujących adhezyny bakteryjne u szczepów klinicznych *S. epidermidis*, wskazuje na ogromne zdolności adhezyjne tych bakterii. U 38% *ica*-pozytywnych szczepów stwierdzono obecność sekwencji insercyjnej IS256, która poprzez odwracalną transpozycję w obszar genów *ica*, może wpływać na zdolność bakterii do tworzenia biofilmu. Analiza struktury biofilmów przy zastosowaniu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego (CLSM) wykazała, że szczep *S. epidermidis* posiadający geny *ica*, *aap*, i *bph* tworzył najbardziej spójną i zwartą strukturę biofilmu, pokrywającą całą komorę hodowlaną. Wysokość biofilmu wynosiła około 25µm. Natomiast znacznie niższą biomasą, wysokością (około 13µm) i luźną strukturą charakteryzowały się biofilny tworzone przez szczepy posiadające w swoim genomie jedynie jeden gen zaangażowany bezpośrednio w adhezję międzykomórkową w biofilnie, to jest gen *icaA*.

Biofilm tworzyło 78% metycyloopornych szczepów *S. haemolyticus*, jednak żaden z nich nie miał genów *icaADBC*, co świadczy o niezależnych od *ica* mechanizmach powstawania bakteryjnego biofilmu u tego gatunku. Mimo braku obecności genów *icaADBC*, 24-godzinny biofilm tworzony przez większość szczepów *S. haemolyticus* odznaczał się zwartą strukturą, kolonizował całą powierzchnię komory, grubość biofilmu wynosiła od 11 μm do 16 μm. Ponadto, obserwacje mikroskopowe dojrzałych biofilmów barwionych barwnikami fluorescencyjnymi z wykorzystaniem Live/Dead BackLight Bacterial Viability Kits, wykazały, że w strukturach biofilmowych dominowały komórki żywe. O roli białek w utrzymywaniu stabilności struktury biofilmu świadczyła jego dezintegracja przez enzym proteolityczny. Wykazano, że proteinaza K w bardzo istotny sposób wpływa na spadek biomasy biofilmu u wszystkich badanych szczepów i jest najbardziej istotnym pod względem objętościowym składnikiem macierzy. W macierzy pozakomórkowej stwierdzono również obecność polisacharydów, ponieważ biofilm ulegał dezintegracji po zastosowaniu nadjodanu sodu (NaIO₄), w mniejszym stopniu odnotowano obecność zewnątrzkomórkowego DNA (Szczuka i wsp. 2015).

W przeciwieństwie do *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. haemolyticus*, zaobserwowano mniejszy odsetek szczepów *S. hominis* (54%) mających zdolność tworzenia biofilmu. Analizowane szczepy tworzyły biofilm w oparciu o mechanizmy zależne od operonu *icaADBC*. Dwadzieścia dwa izolaty pomimo, że miały geny *ica*, zostały zaklasyfikowane jako szczepy nie posiadające zdolności tworzenia biofilmu. Badania nad strukturą zewnątrzkomórkową macierzy wykazały, że najbardziej istotnymi jej komponentami są polisacharydy i białka. Polimery te występują w różnych proporcjach u poszczególnych szczepów *S. hominis*. I tak, nadjodan sodu (NaIO₄), w istotny sposób wpływał na spadek biomasy biofilmu u wszystkich szczepów. Zaobserwowano, że również proteinaza K redukuje biomasę biofilmu powyżej 40% u większości szczepów *S. hominis*. Największą (75%) redukcję biomasy po działaniu proteinazy K zaobserwowano u jednego szczepu. Zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA) jest włączone w strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu *S. hominis*, ale odgrywa znacznie mniejszą rolę w utrzymaniu stabilności struktury dojrzałego biofilmu tego gatunku. Udowodniono, że dodanie DNA-azy do środowiska hodowli bakterii w którym tworzy się biofilm powoduje nieznaczne ograniczenie masy biofilmu u 15 izolatów. Nie zaobserwowano zmian u 11 izolatów. Tak więc można wnioskować, że eDNA nie odgrywa istotnej roli w procesie formowania biofilmu, jest natomiast komponentem zwiększającym integralność jego struktury. Pełniejszy obraz

struktury biofilmu uzyskano w mikroskopie CLSM. Struktura przestrzenna biofilmów była zróżnicowana, unikatowa dla poszczególnych szczepów *S. hominis*, występowały zarówno biofilmy zwarte, jak i biofilmy charakteryzujące się luźną strukturą. Wysokość biofilmu wynosiła od 16µm do 20µm (Szczuka i wsp. 2015).

Zakażenia z udziałem *S. warneri* należą do rzadkich, stąd liczba analizowanych szczepów była stosunkowo niewielka. Znaczenie kliniczne tych bakterii nie budzi kontrowersji, ale wciąż mało wiadomo o mechanizmach patogeniczności, oporności na antybiotyki i strukturze populacji *S. warneri*.

Szczepy kliniczne wykazały duże zróżnicowanie genetyczne, co stwierdzono przy zastosowaniu metody BOX-PCR. Biofilm tworzyło 12 (52%) spośród 23 analizowanych szczepów *S. warneri*. Jedynie dwa izolaty miały geny *icaADBC*, co świadczyło o niezależnych od *ica* mechanizmach powstawania bakteryjnego biofilmu u tego gatunku. Najbardziej istotnym składnikiem macierzy były białka, z wyjątkiem dwóch biofilmów tworzonych przez izolaty *ica*-pozytywne. Zaobserwowano redukcję biomasy biofilmu od 45 do 80% po podaniu proteiny K. Nie uzyskano redukcji masy biofilmu większej niż 15% po zastosowaniu DNA-zy. Ponadto w macierzy stwierdzono obecność polisacharydów. Analiza obrazów biofilmów w mikroskopie konfokalno-skaningowym wykazała, że są one zróżnicowane pod względem spoistości struktury, grubości, całkowitej objętości tworzonej biomasy i zajmowanej przestrzeni w komorze hodowlanej. Wszystkie szczepy *S. warneri* miały zdolność adhezji do komórek nabłonkowych, indeks adhezji wynosił od $0,1 \times 10^2$ do $3,7 \times 10^4$ CFU. Ponadto 43% szczepów wykazało zdolność inwazji komórek HeLa. Szczepy bakteryjne wytwarzały toksyny cytolityczne, które niszczyły komórki nabłonkowe. Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań w sposób jednoznaczny wskazują że mechanizm patogeniczności *S. warneri* jest wieloczynnikowy i obejmuje adhezję, inwazję, cytotoksyczność oraz zdolność tworzenia biofilmu (Szczuka i wsp. 2016).

U trzech izolatów *S. warneri* stwierdzono obecność genów *mecA*, kodujących oporność na antybiotyki β-laktamowe. Gen kodujący białko AAC(6')/APH(2'') odpowiadające za inaktywację gentamycyny, neomycyny, kanamycyny, tobramycyny i amikacyny został wykryty u czterech szczepów. Natomiast obecność genu *aph(3'')-IIIa*, kodującego enzymy modyfikujące kanamycynę i amikacynę stwierdzono u trzech izolatów, również u trzech izolatów stwierdzono obecność genu *ant(4')-Ia* kodującego enzymy modyfikujące tobramycynę, kanamycynę, neomycynę, i amikacynę. Jeden izolat zawierał zarówno geny *aac(6')/aph(2'')* jak i *aph(3'')-IIIa*. Geny warunkujące oporność na makrolidy,

linkozamidy i streptograniny grupy B: *erm(A)*, *erm(C)*, *msr(A)*, *lnu(A)*) występowały odpowiednio u 2 (10%), 2 (10%), 7 (35%) i 3 (15%) szczepów *S. warneri*. Co ważne, większość ww. genów występowała u szczepów zdolnych do wytwarzania biofilmu, była to różnica istotna statystycznie. Lokalizacja genów kodujących oporność na antybiotyki w obrębie ruchomych elementów genetycznych takich jak: kasety SCC_{mec} (*mecA*), plazmidy (*ermC*, *lnuA*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*), transpozony Tn554 (*ermA*), Tn917 (*ermB*), Tn4001 (*aac(6')/aph(2'')*) oraz kumulacja bakterii w strukturze biofilmu, stwarza możliwość łatwego nabywania tych genów w wyniku horyzontalnego transferu genów (Szczuka i wsp. 2016).

Celem kolejnych badań było poznanie mechanizmów wirulencji gronkowców koagulazo-ujemnych sporadycznie izolowanych od chorych: *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. caprae*. Stwierdzono ogromne zróżnicowanie genetyczne badanych szczepów, niektóre z nich miały geny warunkujące oporność na antybiotyki. Gen (*mecA*) występował u 15% szczepów, *aac(6')/aph(2'')* u 11%, *aph(3')-IIIa* u 15%, *ant(4')-Ia* u 19%, *erm(A)* u 4%, *erm(B)* u 13%, *erm(C)* u 41%, *msr(A)* u 11%. Większość gronkowców (64%) miała zdolność adhezji do powierzchni abiotycznej i tworzenia biofilmu *in vitro*. Szczepy zaliczane do gatunków *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. caprae* tworzyły biofilm w mechanizmie zależnym od operonu *ica*. Jedynie szczepy *S. simulans* nie tworzyły biofilmu, jednakże liczba analizowanych izolatów była niska, do badań włączyliśmy siedem izolatów. Analiza obrazów struktury biofilmu w mikroskopie CLSM oraz przy użyciu programu COMSTAT wykazała, że bakterie te formują biofilm charakteryzujący się podobną strukturą tj. tworzą zwartą strukturę i kolonizują powierzchnie komory hodowlanej (od 92% do 100%). Wszystkie szczepy bakteryjne wykazywały zdolność adhezji do komórek HeLa. Ponad połowa szczepów (51%) miała zdolność do wnikania do komórek HeLa, jednakże aktywność inwazyjna bakterii była niska. I tak mediana dla poszczególnych gatunków przedstawiała się następująco: 3% (bakterii wnikających do komórek eukariotycznych) - *S. lugdunensis*, 3%, - *S. cohnii*, 5% - *S. caprae*, 8% - *S. capitis*, 13% - *S. auricularis*. Gronkowce wykazywały również aktywność cytotoksyczną, powodowały lizę 23 - 87% komórek HeLa. Przeprowadzone badania wykazały, że istotną rolę w patogeniczności *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii* i *S. caprae* odgrywa adhezja oraz tworzenie biofilmu (Szczuka i wsp. 2016).

Ocena skuteczności działania leków przeciwbakteryjnych na biofilm gronkowcowy

Infekcje związane z obecnością biofilmu często kończą się niepowodzeniami terapeutycznymi, wynika to z faktu wysokiej oporności bakterii rosnących w populacji biofilmu na leki przeciwbakteryjne. Dlatego też istotnym wydaje się podejmowanie badań mających na celu wyznaczenie najbardziej skutecznych antybiotyków w leczeniu zakażeń biofilmowych. Z bieżącej literatury wynika że, rifampicyna wykazuje zdolność penetracji w biomasę biofilmu i powoduje dezintegrację macierzy otaczającej biofilm bakteryjny. Ponadto antybiotyk ten działa bakteriobójczo na komórki o zwolnionym metabolizmie. Działanie rifampicyny polega na zahamowaniu syntezy mRNA poprzez zablokowanie aktywności polimerazy RNA. Jednakże, ze względu na szybko powstającą oporność bakterii na rifampicynę, nie może być ona stosowana w formie monoterapii (Fey 2010).

W pierwszym etapie badań, analizowano skuteczność działania rifampicyny skojarzonej z tigeocykliną wobec 16 szczepów klinicznych *S. epidermidis* (Szczuka i wsp. 2014). Tigecyklina hamuje syntezę białka poprzez wiązanie się z podjednostką 30S rybosomu i co jest istotne oporność na ten lek powstaje niezwykle rzadko (Aybar i wsp. 2012). Wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii w biofilmie dla tigeocykliny/rifampicyny zawierała się w przedziale od 0,062µg/ml do 0,5µg/ml. W trakcie badań, pojawiło się pytanie, czy tigeyklina z pominięciem rifampicyny będzie tak samo skuteczna wobec biofilmu gronkowcowego jak stosowana z rifampicyną. Tigecyklina wykazała niższą aktywność działania wobec bakterii żyjących w biofilmie niż tigeyklina skojarzona z rifampicyną, wartość minimalnego stężenia hamującego dla tigeocykliny zawierała się w przedziale od 0,125µg/ml do 2µg/ml. Na podkreślenie zasługuje fakt, że tigeyklina z rifampicyną wykazała również wysoką aktywność działania wobec biofilmu tworzony przez bakterie *S. warneri*, które w większości tworzą biofilm w mechanizmie niezależnym od adhezyny PIA (Szczuka i wsp. 2016).

Kolejnym celem badań było porównanie skuteczności działania rifampicyny skojarzonej z daptomycyną oraz rifampicyny skojarzonej z tigeocykliną na biofilm tworzony przez szczepy *S. haemolyticus* (Szczuka i wsp. 2015). Daptomycyna należy do grupy antybiotyków lipopeptydowych. Mechanizm jej działania polega na wiązaniu się z błoną komórkową bakterii, co wywołuje depolaryzację błony i prowadzi do zahamowania syntezy białek, DNA i RNA, co prowadzi do śmierci komórki (Sader i Jones 2012). Tigecyklina wraz z rifampicyną wykazała wyższą aktywność działania wobec bakterii żyjących w biofilmie niż

daptomycyna wraz z rifampicyną. Wartość BIC (*ang.* biofilm inhibitory concentration) dla tigeocykliny/rifampicyny zawierała się w przedziale od 0,062µg/ml do 1µg/ml, a dla daptomycyny/rifampicyny od 0,125µg/ml do 2µg/ml. Gronkowce z wyjątkiem dwóch izolatów (8%) wykazały wrażliwość na tigeocyklinę/rifampicynę (przyjmując za punkt odcięcia wartość MIC wyznaczoną dla form planktonowych). Osiem szczepów (33%) wykazało oporność na daptomycynę/rifampicynę (przyjmując za punkt odcięcia wartość MIC daptomycyny dla szczepów wrażliwych, żyjących w formie planktonowej MIC ≤ 1 µg/ml).

Oceniono również skuteczności działania rifampicyny skojarzonej z tigeocykliną oraz rifampicyny skojarzonej z ciprofloksacyną na biofilm tworzony przez szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych sporadycznie izolowanych od chorych: *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. caprae* (Szczuka i wsp. 2016). Należy zaznaczyć, że ciprofloksycyna jest uznawana za lek skuteczny w leczeniu zakażeń gronkowcowych (Coiffier i wsp. 2013). Chemoterapeutyk ten hamuje syntezę DNA, poprzez inaktywację topoizomerazy IV i gyrazy. Ciprofloksanyna wraz z rifampicyną wykazała niższą aktywność działania wobec bakterii żyjących w biofilmie niż tigeocyklina wraz z rifampicyną. Wartość BIC dla ciprofloksacyny/rifampicyny wynosiła od 0,250µg/ml do 2µg/ml, a dla tigeocykliny/rifampicyny zawierała się w przedziale od 0,062µg/ml do 0,5µg/ml. Wszystkie szczepy wykazały wrażliwość na tigeocyklinę wraz z rifampicyną. Trzy szczepy (15%) wykazały oporność na ciprofloksacynę wraz z rifampicynę (wartość graniczna ciprofloksacyny wyznaczona dla form planktonowych MIC=1).

Ocena wpływu leków przeciwbakteryjnych w stężeniach subinhibicyjnych na ekspresję genów związanych z tworzeniem biofilmu oraz na strukturę biofilmu

Badano wpływ tigeocykliny i ciprofloksacyny w stężeniach subinhibicyjnych (sub-MIC) na ekspresję genów *icaA* (kodującego adhezynę PIA), *altE* (kodującego białko pełniące funkcje adhezyny) i *sigB* (kodującego białko regulatorowe, wpływające na integralność struktury biofilmu) szczepów klinicznych *S. epidermidis* (Szczuka i wsp.2017).

Tigeocyklina w stężeniach odpowiadających wartości 0,5 MIC i 0,25 MIC wpływała na podwyższenie ekspresji genów: *altE* i *sigB* u wszystkich szczepów *S. epidermidis*. Należy podkreślić, że wzrost ekspresji genu *altE* może skutkować bardziej efektywną adhezją do powierzchni abiotycznej i biotycznej. Natomiast wzrost ekspresji genu *sigB*, który odgrywa rolę w stabilizacji biofilmu, może wpływać na większą integralność i oporność struktury

biofilmu na działanie sił mechanicznych funkcjonujących w organizmie, na przykład wywieranych przez przepływający strumień krwi. Przeprowadzone badania, wykazały wzrost ekspresji genu *icaA*, u wszystkich szczepów w obecności tigeocykliny odpowiadającej wartości 0,5 MIC. Jedynie niewielki spadek ekspresji genu *icaA* zaobserwowano u dwóch izolatów (MPU 76 i MPU 51) w obecności tigeocykliny odpowiadającej stężeniu 0,25 MIC. Wzrost ekspresji genu *icaA* może stymulować produkcję adhezyny PIA, co z kolei może prowadzić do wzrostu adhezji międzykomórkowej w biofilmie.

Natomiast ciprofloksacyna w stężeniu odpowiadającym wartości 0,5 MIC powodowała wzrost ekspresji genu *icaA* u trzech izolatów (MPU 52, MPU 57 i MPU 85). Niewielki spadek zaobserwowano dla pozostałych dwóch izolatów (MPU 76 i MPU 51). Natomiast inkubacja w obecności ciprofloksacyny odpowiadającej wartości 0,25 MIC powodowała spadek ekspresji genu u wszystkich izolatów. Ciprofloksacyna w stężeniu subinhibicyjnym (0,5 MIC i 0,25 MIC) powodowała wzrost ekspresji genu *altE*, z wyjątkiem szczepu MPU 76 i MPU 51 w przypadku inkubacji w stężeniu odpowiadającym 0,25 MIC. Ciprofloksacyna w stężeniu subinhibicyjnym 0,5 MIC powodowała spadek ekspresji *sigB* dwóch szczepów MPU 76 i MPU 51, a wzrost ekspresji u trzech szczepów (MPU 52, 57, 85). Badania wykazały, że ciprofloksacyna moduluje ekspresję genów zaangażowanych w tworzenie biofilmu, jednak jej efekt jest zależny od szczepu.

Analiza obrazów w mikroskopie konfokalnym przy zastosowaniu programu COMSTAT, uwidoczniła zmiany w architekturze biofilmu tworzonego w obecności tigeocykliny i ciprofloksacyny w stężeniach subinhibicyjnych (0,5 MIC i 0,25 MIC) w porównaniu z biofilmem tworzonym bez antybiotyku. Biofilm tworzony w obecności tigeocykliny w stężeniu sub-MIC charakteryzował się zwiększeniem biomasy, zwiększeniem wysokości, wzrostem zajmowanej przestrzeni w porównaniu z kontrolą. Wskazuje to na wpływ tigeocykliny w stężeniach sub-MIC na wirulencję bakterii, co może mieć znaczenie w przebiegu infekcji bakteryjnej. Natomiast ciprofloksacyna odznaczająca się innym mechanizmem działania na komórkę bakteryjną w porównaniu z tigeocykliną, również w odmienny sposób modyfikuje strukturę przestrzenną biofilmu. W stężeniach subinhibicyjnych powoduje zmniejszenie grubości biofilmu, zmniejszeniem jego biomasy, redukcję zajmowanej powierzchni przez biofilm i wpływa na większe zróżnicowanie jego struktury. Wskazuje to na działanie hamujące tego chemioterapeutyku na wzrost biofilmu, co może ograniczać rozwój zakażenia w organizmie chorego i jest niewątpliwie korzystne dla prowadzonej terapii.

W świetle prezentowanych wyników wydaje się niezwykle istotne podjęcie dalszych badań nad wpływem leków przeciwbakteryjnych w stężeniach sub-MIC na ekspresję genów zaangażowanych w wirulencję gronkowców. Zgodnie z wiedzą autora nie ma badań dotyczących wpływu glikopeptydów nowej generacji (dalbawancyny, orytawancyny), leków niezwykle skutecznych w leczeniu infekcji skórnych, czy też nowych fluorochinolonów (moksyflokscyny, lewoflokscyny) na ekspresję genów kodujących gronkowcowe toksyny bakteryjne (hemolizyny, toksyny z rodziny PSM) i adhezyny bakteryjne. Zagadnienie to jest niezwykle istotne z punktu widzenia przeprowadzanej terapii antybiotykowej, gdyż lek, który nie wywiera bezpośredniego efektu bójkowego na komórkę bakteryjną, może modulować ekspresję genów zaangażowanych w patogenezę bakterii i modyfikować czynniki wirulencji, co z kolei w istotny sposób może wpływać na przebieg infekcji bakteryjnej.

Podsumowanie

- Szczepy kliniczne należące do gatunków *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii*, *S. caprae* mają zdolności tworzenia złożonych struktur biofilmowych *in vitro*.
- Szczepy *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. caprae* tworzą biofilm w mechanizmie zależnym od genów *icaADBC*. Izolaty należące do gatunku *S. aureus* i *S. warneri* mają zdolność tworzenia złożonych struktur biofilmowych pomimo braku obecności ww. genów. *S. haemolyticus* tworzy biofilm w mechanizmie niezależnym od operonu *icaADBC*.
- Istotną rolę w patogeniczności *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii* i *S. caprae* odgrywa adhezja oraz tworzenie biofilmu.
- *S. aureus* i gronkowce koagulazo-ujemne wywołujące zakażenia u ludzi wykazują duże zróżnicowanie genetyczne.
- Tigecyklina w kombinacji z rifampicyną wykazuje wyższą aktywność działania wobec bakterii żyjących w biofilmie niż daptomycyna z rifampicyną oraz ciprofloksacyna z rifampicyną.
- Tigecyklina i ciprofloksacyna w stężeniach subinhibicyjnych modulują ekspresję genów *icaA*, *altE* i *sigB*, zaangażowanych w tworzenie biofilmu oraz wpływają na strukturę biofilmu.

Literatura uzupełniająca

1. Aybar Y., Ozaras R., Besirli K., Engin E., Karabulut E., Salihoglu T., Mete B., Tabak F., Mert A., Tahan G., Yilmaz M.H., Ozturk R. 2012. Efficacy of tigecycline and vancomycin in experimental catheter-related *Staphylococcus epidermidis* infection: microbiological and electron microscopic analysis of biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 338–342.
2. Becker K., Heilmann C., Peters G. 2014. Coagulase-negative *Staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870–926.
3. Coiffier G., Albert J.D., Arvieux C. Guggenbuhl P. 2013. Optimizing combination rifampin therapy for staphylococcal osteoarticular infections. *Joint Bone Spine* 80, 11–17.
4. Davies J., Spiegelman G.B., Yim G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 445-53.
5. Fey P.D. 2010. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 610– 615.
6. Garzoni C., Kelley W.L. 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends. Microbiol.* 17, 59-65.
7. Gould I.M., David M.Z., Esposito S., Garau J., Lina G., Mazzei T., Peters G. 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39, 96-104.
8. Jefferson K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163-173.
9. Kaplan J.B. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 34, 737-751.
10. Otto M. 2008. Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 322: 207–228.
11. Otto, M. 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 34, 201-214.
12. Otto M.P., Martin E., Badiou C., Lebrun S., Bes M. Vandenesch F., Etienne J., Lina G., Dumitrescu O. 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1524-32.
13. Rohde H., Mack D., Christner M., Burdelski C., Franke, G., Knobloch J.K-M. 2006. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev. Med. Microbiol.* 17, 45–54.
14. Sader H.S., Jones R.N. 2012. Antimicrobial activity of daptomycin in comparison to glycopeptides and other antimicrobials when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73, 212-214.
15. Smith K., Gould K.A., Ramage G., Gemmell C.G., Hinds J. Lang S. 2010. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54, 380-387.

16. Valour F., Trouillet-Assant S., Rasigade J.P., Lustig S., Chanard E., Meugnier H., Tigaud S., Vandenesch F., Etienne J., Ferry T. Laurent F. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in orthopedic device infections: the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One* 8, e67240.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo–badawczych

Równoległe z głównym nurtem moich badań, prowadziłam badania dotyczące zróżnicowania kaset SCCmec (ang. staphylococcal cassette chromosome mec) występujących w genomach bakterii z gatunku *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. haemolyticus*. Kasety SCCmec są mobilnymi elementami genetycznymi (ang. mobile genetic elements, MGE), które na drodze transferu horyzontalnego mogą być przekazywane między szczepami tego samego gatunku, a także między szczepami różnych gatunków. Kasety SCCmec zawierają zwykle gen *mecA*, który warunkuje oporność gronkowców na metycylinę, co oznacza oporność na antybiotyki β-laktamowe, z wyjątkiem cefalosporyny V generacji – ceftobiprolu. Gen *mecA* odpowiedzialny jest za wytwarzanie zmienionego białka wiążącego penicylinę – PBP2a (penicillin binding protein 2a), które dzięki obniżonemu powinowactwu do antybiotyków β-laktamowych, zachowuje swoją funkcję enzymatyczną i uczestniczy w syntezie ściany komórkowej. W strukturę SCCmec często wbudowane są mobilne elementy genetyczne tj: plazmidy, transpozony, sekwencje inercyjne, w których mogą być zlokalizowane geny warunkujące oporność na aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy i tetracykliny oraz geny warunkujące wirulencje bakterii. Elementy SCCmec są klasyfikowane na różne typy na podstawie występującego kompleksu genów *mec* oraz rekombinazy *ccr*, która umożliwia wycinanie i specyficzną integrację kasety z chromosomem bakteryjnym.

Badania wykazały olbrzymią różnorodność kaset u *S. haemolyticus* (Szczuka i wsp. 2016). U 18% szczepów tego gatunku zidentyfikowano kasetę typu V, zawierającą klasę C kompleksu *mec* i rekombinazę typu *ccrC*. U trzech izolatów zidentyfikowano geny *ccrC*, ale nie zidentyfikowano kompleksu *mec*. U jednego szczepu stwierdzono występowanie kasety SCCmec mającej zidentyfikowany kompleks *mec*- klasę C i nieznaną typ rekombinazy *ccr*. Badania wskazują, że kompleks *mec*- klasa C może występować w sposób niezwiązany z genami *ccrC*. U czterech izolatów stwierdzono występowanie klasy B kompleksu *mec*, podczas gdy żaden izolat nie miał kompleksu *mec* klasy A. Ponadto, opisano występowanie

kasety SCC*mec* o unikatowej kompozycji kompleksu *mec* i *ccr*. Zawiera ona klasę B kompleksu *mec* i gen rekombinazy typu *ccrAB*_{SHP}. Ten typ rekombinazy został również wykryty u dwóch szczepów *S. haemolyticus*, u których nie został zidentyfikowany kompleks *mec*. U 70% badanych szczepów nie można było zidentyfikować kompleksu *mec* i rekombinazy, gdyż najprawdopodobniej zawierają do tej pory nieopisane kompleksy *mec* oraz allotypy genu rekombinazy chromosomowej. Sekwencjonowane geny *ccr*, zostały zarejestrowane w GenBanku, association number KU523873 i KU523874. W wyniku przeprowadzonej analizy, okazało się, że sekwencja *ccrA* (KU523874) wykazała wysokie podobieństwo ($\geq 96\%$) do sekwencji *ccrA2* występującej u *S. aureus* M06/0075 i JCSC6668 N315. Podobnie sekwencja *ccrB* (KU523873) była identyczna w 97% do sekwencji *ccrB2* stwierdzonych u *S. aureus* JCSC1968 i *S. epidermidis* CS8.

Ogromne zróżnicowanie kaset wśród szczepów *S. haemolyticus* kontrastuje z ograniczoną liczbą kaset nietypowych obserwowanych u *S. epidermidis* (Szczuka i wsp. 2016). U tego gatunku zidentyfikowano kasetę SCC*mec* typu IV (69%), III (23%) i II (3%). Jedynie u trzech izolatów wykazano obecność kaset nietypowych, mających zidentyfikowany kompleks *mec*–klasę B, a nieokreślony typ rekombinazy. Rezultaty tych badań świadczą, że kasety SCC*mec* u szczepów tego gatunku są elementami wysoce konserwatywnymi, u których rzadko dochodzi do rearanżacji kompleksu genu *mec* i *ccr* i powstania nowych wariantów kaset. Na podkreślenie zasługuje fakt, że u *S. epidermidis* dominuje kasetą typu IV, która zwykle warunkuje oporności jedynie na antybiotyki β -laktamowe. Kasetą ta charakteryzuje się małą wielkością co wskazuje na wyższą mobilność w porównaniu do większych typów kaset. Obecnie panuje pogląd, że szczepy *S. epidermidis* stanowią rezerwuar kaset SCC*mec* dla metycylinowrażliwych szczepów gronkowca złocistego.

Jednakże, u większości szczepów szpitalnych *S. aureus* (HA-MRSA – hospital-acquired MRSA) stwierdzono występowanie kaset typu III (62%) i II (24%) (Szczuka i wsp. 2013). W kasetach tego typu, oprócz genu *mecA*, ulokowane są geny warunkujące oporność na inne klasy antybiotyków, co skutkuje wieloopornością. Jedynie u 10 szczepów HA-MRSA oraz u czterech szczepów MRSA występujących poza środowiskiem szpitalnym (CA-MRSA – community acquired MRSA) zidentyfikowano kasetę typu IV. U szczepów *S. aureus* określono występowanie genów kodujących toksyny bakteryjne, które pełnią istotną rolę w patogenezie zakażeń powodowanych przez te bakterie. Najbardziej rozpowszechnione okazały się geny kodujące leukocydynę Panton-Valentine (PVL), które występowały u dziewięciu szczepów HA-MRSA i czterech szczepów zaklasyfikowanych jako CA-MRSA. Toksyna PVL wykazuje

aktywność cytotoksyczną w stosunku do neutrofilów oraz monocytów i makrofagów, przełamując pierwszą linię obrony układu odpornościowego organizmu. Ponadto, dane literaturowe wskazują na zaangażowanie toksyny PVL w patomechanizm martwiczego zapalenia płuc poprzez indukcję apoptozy neutrofilii. U trzech szczepów MRSA wykryto geny *tst*, które nie rozprzestrzeniły się w populacji gronkowców, pomimo że zlokalizowane są na ruchomym elemencie chromosomu, wyspie patogenności SaPI. Toksyna TSST-1 zaliczana jest do superantygenów, które powodują nadmierną mobilizację układu immunologicznego z pominięciem drogi klasycznej, wywołując niespecyficzną poliklonalną proliferację limfocytów T, które z kolei uwalniają w nadmiarze cytokiny prozapalne, prowadząc do charakterystycznych objawów wstrząsu toksycznego. Nasze badania wskazują również na niską częstość występowania u klinicznych szczepów *S. aureus* genów *eta* (1%) i *etb* (9%) zlokalizowanych odpowiednio w chromosomie bakteryjnym i w plazmidzie. Geny te kodują eksfoliatyny, proteiny serynowe, które hydrolizują desmogleinę warstwy ziarnistej naskórka, prowadząc do złuszczonego zapalenia skóry.

Do podjęcia badań nad molekularnymi mechanizmami oporności na antybiotyki z grupy MLS_B skłonił nas słabo poznany mechanizm tej oporności u bakterii *S. hominis* (Szczuka i wsp. 2016). Metylacja miejsca wiązania antybiotyku na podjednostce 50S rybosomu, przeprowadzana przez enzymy adenilo-N-metylotransferazy Erm (erythromycin ribosome methylase) jest najistotniejszym mechanizmem oporności na makrolidy i linkozamidy u bakterii tego gatunku. Dominują geny *erm* (C). Obecność genu *erm*(B) stwierdzono u 25% szczepów, a gen *erm*(A) identyfikowano znacznie rzadziej, jedynie u 15% szczepów. Mechanizm aktywnego usuwania antybiotyku z komórki bakteryjnej, uwarunkowany obecnością białek błonowych kodowanych przez geny *msr*(A) występował u 18% szczepów. Znaczny odsetek szczepów *S. hominis* (31%) posiadał gen *lnuA*, kodujący nukleotydtransferazę, która odpowiedzialna jest za enzymatyczną inaktywację linkomycyny.

Podjęłam również badania, których celem było ustalenie jednoczesnego występowania genu *mecA* i genów warunkujących oporność na aminoglikozydy u klinicznych szczepów *S. haemolyticus* (Krzymińska i wsp. 2015). Należy podkreślić, że bakterie z tego gatunku mają ogromną zdolność kumulowania genów oporności na antybiotyki w genomie bakteryjnym. U 63% szczepów opornych na metycylinę stwierdzono obecność przynajmniej jednego z genów kodujących enzymy modyfikujące aminoglikozydy, określane skrótem AME (aminoglycoside-modifying-enzyme). U 33% stwierdzono występowanie dwóch genów kodujących AME, *aac*(6')/*aph*(2'') i *aph*(3'')-IIIa. Najbardziej rozpowszechnionym był gen *aph*(3'')-IIIa (43%) kodujący enzymy wykazujące aktywność fosfotransferazy, które

modyfikują kanamycynę i amikacynę. Gen *aac(6')/aph(2'')* kodujący dwudomenowe białko AAC(6')/APH(2'') wykazujące aktywność acetylotransferazy AAC(6') i fosfotransferazy APH(2'') występował u 33% szczepów. Co ważne, białko AAC(6')/APH(2'') odpowiada za inaktywację gentamycyny, neomycyny, kanamycyny, tobramycyny i amikacyny. Natomiast gen *ant(4')-Ia*, który warunkuje oporność na tobramycynę, kanamycynę, neomycynę, i amikacynę, obecny był u 20% szczepów.

Badalam także występowanie genów *ileS-2* kodujących oporność na mupirocynę (Szczuka i wsp. 2009). Lek ten jest niezwykle skuteczny w likwidacji nosicielstwa metycylinoopornego gronkowca złocistego. Należy zaznaczyć, że eliminacja nosicielstwa u hospitalizowanych pacjentów, jest bardzo ważnym środkiem profilaktycznym zmniejszające ryzyko, wystąpienia pooperacyjnych zakażeń gronkowcowych. Oporność na mupirocynę związana jest z obecnością plazmidowego genu *ileS-2*, kodującego syntetazę izoleucyno-tRNA nie ulegającą inhibicji przez ten antybiotyk. Badaniami objęto 78 izolatów, należących do gatunku *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* i *S. simulans*. Gen *ileS-2* występował u dwóch szczepów z gatunku *S. epidermidis*, co wskazuje że gronkowce koagulazo-ujemne mogą być rezerwuarem tego genu.

Ponadto moje dotychczasowe prace naukowe koncentrowały się na analizowaniu podobieństwa genetycznego szczepów klinicznych. Do różnicowania 135 izolatów MSSA (*ang.* methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) wykorzystano metodę RFLP (*ang.* Restriction Fragment Length Polymorphism) polegającą na analizie restrykcyjnej fragmentów zmiennych regionu HVR (*ang.* hypervariable region), genu *spa* kodującego powierzchniowe białko A i genu *coa* odpowiedzialnego za produkcję koagulazy (Szczuka i wsp. 2010). Natomiast wewnątrzgatunkowe różnicowanie szczepów *S. haemolyticus* badano przy pomocy techniki REP-PCR, bazującej na występowaniu repetytywnych sekwencji, REP (*ang.* repetitive extragenic palindromic) w genomie bakterii (Krzymińska i wsp. 2013). Podjęłam również próbę wykorzystania techniki MLVA (*ang.* multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) do typowania szczepów *S. hominis* (Szczuka i wsp. 2014). Metoda ta opiera się na jednoczesnej amplifikacji wielu loci o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń. Przy użyciu oprogramowania Tandem Repeats Finder zidentyfikowano 142 tandemowych powtórzeń znajdujących się w genomie *S. hominis* SK 119. Do dalszej analizy wybrano 11, biorąc pod uwagę długość sekwencji, liczbę kopii oraz lokalizacje w genomie bakteryjnym. Typowanie w oparciu o dwie z tandemowych powtórzeń dało najlepsze rezultaty,

wyodrębniono profile genetyczne charakteryzujące się heterogenicznym układem prążków. Metoda ta umożliwiała typowanie wszystkich izolatów. Następnie porównano siłę dyskryminacyjną analizowanej metody MLVA w odniesieniu do typowania szczepów metodą BOX-PCR. Analiza uzyskanych wyników jednoznacznie wskazała, że metoda BOX-PCR odznaczała się wyższym potencjałem różnicującym.

Typowanie bakterii należących do rodzaju *Aeromonas* było przedmiotem mojej pracy doktorskiej (Szczuka i Kaznowski 2004; Szczuka i Kaznowski 2005; Szczuka i Kaznowski 2007). Pałeczki Gram–ujemne z rodzaju *Aeromonas* są szeroko rozpowszechnione w środowisku wodnym. Są istotnym czynnikiem etiologicznym zakażeń ryb. Szczepy *Aeromonas* sp. mogą powodować zakażenia przewodu pokarmowego objawiające się biegunką, o ostrym lub łagodnym przebiegu, zakażenie ran, posocznicę, zapalenie tkanki łącznej, zapalenie otrzewnej oraz zapalenie opon mózgowych. Analiza szczepów pochodzących z różnych nisz ekologicznych i obszarów geograficznych wykazała zróżnicowanie genetyczne poszczególnych gatunków *Aeromonas*. Stwierdzono, że klony pochodzące z terenu Europy nie wykazują podobieństwa z klonami izolowanymi na terenie Tajlandii i Hongkongu. Metody RAPD i ERIC-PCR umożliwiają wewnątrzgatunkowe różnicowanie badanych szczepów i odznaczają się podobnym potencjałem różnicującym. Natomiast metoda rep-PCR nie umożliwia różnicowania wszystkich szczepów zaliczanych do poszczególnych gatunków *Aeromonas* oraz wykazuje niski potencjał różnicujący. Ponadto wykazano, że bakterie wyizolowane z tego samego źródła niekiedy mają podobne profile białkowe. Różnicowanie wewnątrzgatunkowe *Aeromonas* przy zastosowaniu elektroforezy protein wyizolowanych z komórek bakteryjnych jak i białek wyekstrahowanych z przestrzeni peryplazmatycznej wykazało mniejszą siłę różnicującą w porównaniu z metodami RAPD i ERIC-PCR. Ponadto stwierdzono, że metody fenotypowe oparte na analizie elektroforetycznej białek komórkowych i genotypowe, RAPD, ERIC i REP-PCR, nie umożliwiają identyfikacji bakterii. Badania wykonałam dzięki środkom finansowych pozyskanym z Komitetu Badań Naukowych jako Grant promotorski KBN nr 6 P04C 064 19 pt. „Taksonomiczne typowanie szczepów *Aeromonas* sp.”. Praca doktorska zatytułowana: „Typowanie bakterii należących do rodzaju *Aeromonas*” została wyróżniona przez Radę Wydziału Biologii UAM w Poznaniu. Drugi nurt badań, w który uczestniczyłam w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora dotyczył wirulencji bakterii z rodzaju *Aeromonas* sp.

W okresie trwania mojej pracy, byłam również wykonawcą grantu Grant Ministerstwa Nauki i Informatyzacji nr 2PO4G 003 30 pt. „Wpływ zlewni rzek Wełny i Nielby na zmiany struktury zbiorowisk glonów”. Wełna i Nielba są to niewielkie rzeki na terenie Wielkopolski, których wody krzyżują się, co jest rzadkim przypadkiem w skali Europy. Głównym celem badań było określenie zmian w liczebności bakterii heterotroficznych w wodach dwóch rzek przed i za skrzyżowaniem (Messyasz i wsp 2010; Messyasz i wsp 2010). Badania prowadzono od października 2006 do września 2007 roku. Woda pobierana była w cyklu miesięcznym na 4 stanowiskach, które umiejscowione były 500 metrów przed i za skrzyżowaniem rzek. We wszystkich miesiącach prowadzonych badań liczebność bakterii heterotroficznych zdolnych do wzrostu w temperaturze 22⁰C i 37⁰C była wyższa w wodzie rzeki Wełny niż Nielby. Zaobserwowano spadek liczby bakterii w wodzie rzeki Wełny za skrzyżowaniem z Nielbą. Natomiast stwierdzono wyższą liczebność bakterii w analizowanych próbach wody rzeki Nielby za skrzyżowaniem z Wełną. Jednakże, zmiany liczebności bakterii psychrofilnych i mezofilnych notowane w toni wodnej Nielby były mniejsze niż te obserwowane w rzece Wełnie. Również zmiany liczebności bakterii z grupy coli były mniejsze w wodach rzeki Nielby niż Wełny. Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskować można, że skrzyżowanie rzek wpływa na stan bakteriologiczny wód Nielby i Wełny. Nie można jednak wykluczyć wpływu także innych czynników na stan liczebności bakterii obu tych rzek. Należy brać pod uwagę, że Wełna na odcinku przed skrzyżowaniem z Nielbą narażona jest na ciągły dopływ ścieków ze stawów rybnych, podczas gdy do Wełny za skrzyżowaniem nie docierają tak intensywnie ścieki. O intensywnie prowadzonych procesach przekształceń biopolimerów organicznych zachodzących w rzece Wełna i Nielba świadczyła wysoka liczebność bakterii amylolitycznych, proteolitycznych oraz lipolitycznych.

Moja praca naukowa obejmowała ponadto redagowanie prac przeglądowych. Celem pierwszej pracy było przedstawienie molekularnych metod identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (Szczuka i wsp. 2013). Metody te oparte są na bezpośrednim sekwencjonowaniu konserwatywnych genów: 16SrRNA, *gap* (kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego), *hsp60* (kodującego białko szoku cieplnego HSP60), *dnaJ* (kodującego białko szoku cieplnego DnaJ), *tuf* (kodującego czynnik Tu uczestniczący w procesie elongacji łańcucha peptydowego), *sodA* (kodującego dysmutazę nadtlenkową), *rpoB* (kodującego podjednostkę beta polimerazy RNA), analizie restrykcyjnej wyżej wymienionych genów, analizie real-time PCR oraz spektroskopii mas. W kolejnej pracy zatytułowanej „Zróżnicowanie kaset SCC*mec* u metycylinoopornych gronkowców koagulo-

ujemnych” przedstawiona została organizacyjna struktura kaset SCCmec, ich klasyfikacja i identyfikacja oraz rola kaset SCCmec w rozprzestrzenianiu oporności na antybiotyki (Szczuka i wsp. 2014).

Podsumowując, efektem mojej działalności naukowo-badawczej jest 26 publikacji naukowych (wliczając publikacje stanowiące osiągnięcie habilitacyjne), z czego 24 powstały po doktoracie. Dwadzieścia cztery pozycje stanowią prace oryginalne, zaś dwie – przeglądowe. Znakomita większość (23) artykułów opublikowana została w czasopismach z listy Journal Citation Report posiadających *Impact Factor* (część A wykazu MNiSW), a trzy opublikowane w czasopismach nie posiadających współczynnika *Impact Factor* (część B wykazu MNiSW). Sumaryczny *Impact Factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 29,625, a ogólna liczba punktów MNiSW wynosi 430. Indeks Hirscha $H = 5$ (baza Web of Science). Łącznie moje prace były cytowane 102 razy według bazy Web of Science, 195 razy według bazy Google Scholar.

15.05.2017r.

Ewa Szczuka