

Ksenia Szymanek-Majchrzak^{1*}, Sylwia Wodzyńska¹, Andrzej Młynarczyk², Grażyna Młynarczyk¹

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR MUCOPOLYSACCHARIDE AND BIOFILM UNDER DIFFERENT OXYGEN CONDITIONS BY CLINICAL ISOLATES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NON-SUSCEPTIBLE TO GLYCOPEPTIDES

PRODUKCJA ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO MUKOPOLISACHARYDU ORAZ BIOFILMU W WARUNKACH ZRÓŻNICOWANEJ DOSTĘPNOŚCI TLENU, PRZEZ KLINICZNE IZOLATY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NIEWRAŻLIWE NA GLIKOPEPTYDY

¹Department of Medical Microbiology, Medical University of Warsaw

²Department of Medical Microbiology, The Infant Jesus Teaching Hospital

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

²Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus

ABSTRACT

INTRODUCTION. *Staphylococcus aureus*, which is able to produce an extracellular mucopolysaccharide (MP) and biofilm (SP), is an important etiologic agent in persistent and implant-related infections. This phenotype may be expressed in different levels and character depending on various environmental and/or global intracellular regulatory mechanisms. It may also be induced by sub-inhibitory concentrations of some antibiotics, for example vancomycin. The main aim of the study was to assess the ability to produce MP and SP in different oxygen conditions by clinical isolates of *S.aureus* non-susceptible to glycopeptides.

MATERIALS AND METHODS. Clinical isolates of health-care associated methicillin resistant *S. aureus* (HA-MRSA) strains, non-susceptible to glycopeptides (GRSA, 47) and heterogeneous vancomycin intermediate *S. aureus* isolates (h-VISA, 8). Control group consisted of the following strains: 55 belonging to MRSA, vancomycin susceptible, VSSA and 19 as methicillin susceptible, MSSA/VSSA. The ability to produce MP was investigated according to Freeman method. SP production was tested by means of Christensen procedure.

RESULTS. In aerobic conditions MRSA/GRSA and MRSA/h-VISA isolates were the strongest mucopolysaccharide (SMP) producers (12.2% and 28.6% SMP/MP), but MSSA/VSSA were the most frequent MP (100%). In anaerobic atmosphere, all isolates from all groups were MP-positive. MRSA/h-VISA were the strongest MP producers (75% SMP/MP), but MSSA/VSSA were the most susceptible to oxidative stress (the percentage of SMP among MP for MSSA/VSSA increased by 15.8 times). Each evaluated group of clinical *S. aureus* isolates in aerobic condition had representation in SP positive phenotype: MRSA/GRSA and MRSA/h-VISA, 63.9% and 62.5%; MRSA/VSSA and MSSA/VSSA, respectively 80% and 94.7%. For all mentioned groups of bacteria, SSP variants were present and the amount of values was higher than in similar results obtained in CRA method. The strongest slime producers (60%) were h-VISA strains. The results obtained in Christensen method for anaerobic conditions, were not conclusive due to insufficient optimization of the test parameters.

SUMMARY AND CONCLUSIONS. Both methods reveal that MRSA isolates non-susceptible to glycopeptides are the strongest producers of both MP and SP. That is probably due to cell wall alterations and global regulatory system Agr disorders. The Christensen procedure allow to assess both *ica*- dependent and *ica*- independent (adhesive) mechanisms of slime production and allow to notice that, as a phenotyping “biofilm booster effect”. *ica*- dependent mechanism, which dominated in MSSA/VSSA strains, demonstrate phenotype with more susceptibility to oxygen stress conditions than adhesive one.

Keywords: anaerobic conditions, biofilm, GRSA, h-VISA, *Staphylococcus aureus*, vancomycin

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE. Szczepy *Staphylococcus aureus*, posiadające zdolność do produkcji biofilmu, stanowią istotny czynnik etiologiczny w patogenezie zakażeń o charakterze przewlekłym oraz związanych z wprowadzeniem do organizmu człowieka ciała obcego. Wyrażenie tego fenotypu *in vivo* uzależnione jest od warunków środowiskowych oraz złożonych,

wewnątrzkomórkowych mechanizmów regulacyjnych. Może być też bezpośrednio związane z działaniem subinhibicyjnych stężeń niektórych antybiotyków. Celem podjętych badań była ocena zdolności szczepów *S. aureus* nie-wrażliwych na glikopeptydy do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu (MP) oraz biofilmu (SP), w warunkach zróżnicowanej dostępności tlenu.

MATERIAŁY I METODY. HA-MRSA (health-care associated methicillin resistant *S. aureus*), nie-wrażliwe na glikopeptydy (GRSA, 47 oraz h-VISA, 8), 55 szczepów MRSA wrażliwych na wankomycynę, VSSA oraz 19 MSSA/VSSA. Cechę MP oceniano zgodnie z metodą Freeman'a. Zdolność SP badano według metody Christensena.

WYNIKI. W warunkach tlenowych zdolność do produkcji MP na najwyższym poziomie wykazywały szczepy MRSA/GRSA oraz MRSA/h-VISA (12.2% i 28.6%), natomiast MSSA/VSSA wykazywały cechę MP z najwyższą częstością (100%). W warunkach beztlenowych wszystkie analizowane szczepy były MP-pozytywne. MRSA/h-VISA wykazywały cechę MP na poziomie najwyższym poziomie, 75%. MSSA/VSSA wykazywały największą wrażliwość na stres oksydacyjny (15.8-krotny wzrost odsetka SMP w puli MP).

W warunkach tlenowych we wszystkich grupach występowały warianty produkujące biofilm i stanowiły odpowiednio: MRSA/GRSA i MRSA/h-VISA, 63.9% i 62.5%; MRSA/VSSA i MSSA/VSSA, 80% i 94.7% i były wyższe od analogicznych uzyskanych w metodzie Freeman'a. Na najwyższym poziomie biofilm produkowały warianty h-VISA (60%).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI. W obydwu metodach zdolność do produkcji MP/SP na najwyższym poziomie wykazywały szczepy nie-wrażliwe na glikopeptydy. Związane jest to z zaburzeniami struktury ściany komórkowej oraz systemu regulatorowego Agr. Metoda Christensena pozwala na ocenę MP/SP w mechanizmie *ica*-zależnym oraz *ica*-niezależnym. Mechanizm *ica*-zależny, który dominował u MSSA/VSSA wykazywał największą wrażliwość na warunki stresu oksydacyjnego.

Słowa kluczowe: *biofilm*, *GRSA*, *h-VISA*, *Staphylococcus aureus*, *wankomycyna*, *warunki beztlenowe*

INTRODUCTION

Biofilm is a three-dimensional, dynamic bacterial community, embedded in the extracellular matrix composed of lipids, polysaccharides (polysaccharide inter cellular adhesin/poly-N-succinyl- β -1,6-glucosamine, PIA/PNSG), adhesins (including ClfA/B, FnbA/B, Cna, SpaA, Emb, Alt, Bap and SasG) and eDNA (extracellular DNA). Biofilm can be formed on non-living surfaces (biomaterials) and living tissues. It is subject to complex mechanisms and regulatory factors, including Agr, SrrAB, SigB, SarA, Spx, Rbf, ArlR/S and CidA; it depends on environmental conditions and may be the cause of numerous diagnostic and therapeutic problems. *S. aureus* biofilm plays a special role in the development of both chronic and generalized infections (sepsis, endocarditis, osteomyelitis, joints, arthritis, pneumonia in patients with cystic fibrosis). These infections are often associated with the introduction of a foreign body into the human organism: an implant, prosthesis or catheter (1, 2, 3, 4).

It is assumed that up to 80% of nosocomial infections with a staphylococcal etiology are related to strains' ability to produce biofilms. Vancomycin is the treatment of choice, effective in the therapy of severe forms of infection with MRSA etiology (methicillin-resistant *S. aureus*). Although some *S. aureus* strains do not have *vanA* or *vanB* operons, they show resistance to glycopeptides (glycopeptide-resistant *S. aureus*, GRSA) or low susceptibility (heterogeneous vancomycin intermediate *S. aureus*, h-VISA). Vancomycin therapy in their case often fails (5, 6).

WSTĘP

Biofilm jest trójwymiarową, dynamiczną społecznością bakteryjną, osadzoną w macierzy zewnątrzkomórkowej, zbudowanej z lipidów, polisacharydów (PIA/PNSG, polysaccharide inter cellular adhesin/poly-N-succinyl- β -1,6-glucosamine), adhezyn (m.in. ClfA/B, FnbA/B, Cna, SpaA, Emb, Alt, Bap, SasG) i eDNA (extracellular DNA). Biofilm może powstawać na powierzchniach nieożywionych (biomateriały) oraz tkankach żywych. Podlega złożonym mechanizmom oraz czynnikom regulacyjnym (m.in. Agr, SrrAB, SigB, SarA, Spx, Rbf, ArlR/S, CidA), zależy od warunków środowiska i może być przyczyną licznych problemów diagnostycznych oraz terapeutycznych. Biofilm *S. aureus* odgrywa szczególną rolę w rozwoju zakażeń, zarówno o charakterze przewlekłym, jak i uogólnionym (posocznica, zapalenie wsierdza, szpiku kości, stawów, zapalenie płuc u pacjentów z mukowiscydozą). Zakażenia te często są związane z wprowadzeniem do organizmu człowieka ciała obcego: implantu, protezy czy cewnika (1, 2, 3, 4).

Uznaje się, iż nawet 80% zakażeń szpitalnych o etiologii gronkowcowej, związanych jest ze zdolnością szczepów do produkcji biofilmu. Lekiem z wyboru, skutecznym w leczeniu ciężkich postaci infekcji o etiologii MRSA (methicillin resistant *S. aureus*), jest wankomycyna. Jednak niektóre szczepy *S. aureus*, choć nie posiadają operonów *vanA* ani *vanB*, wykazują oporność na glikopeptydy (glycopeptide resistant *S. aureus*, GRSA) lub niską wrażliwość (heterogeneous vancomycin intermediate *S. aureus*, h-VISA). W ich przypadku terapia wankomycyną często kończy się

Most likely, apart from changes in the structure and thickness of peptidoglycan in these strains, disorders of autolytic processes play an important role in expressing the glycopeptide-resistant phenotype (6, 7, 8). The reduced susceptibility to vancomycin, resulting from the above mechanism, may be an important predisposing factor for biofilm production. It also seems that oxygen availability, which is associated with infection location, may have a significant impact on *S. aureus* ability to produce biofilm (9).

This study focused on the research aimed at assessing the ability of clinical HA-MRSA (health-care associated MRSA) isolates resistant to glycopeptides to produce extracellular mucopolysaccharide and biofilm under varying oxygen availability. In addition, the results were compared with analogous data obtained for the following strains: MRSA, vancomycin-susceptible *S. aureus* (VSSA), and susceptible to both methicillin (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) and vancomycin (VSSA).

MATERIALS AND METHODS

Characterization of bacterial strains

The analysis involved a total of 129 clinical *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients from 12 wards: surgical (34), neonatal (26), orthopedic (19), intensive care unit, ICU (13), dermatological (13), hematological (9), oncological (4), transplantological (4), gynecological (3), internal (2), ophthalmological (1) and endocrinological (1) from three large Warsaw clinical centers. The strains were isolated from the following clinical materials: wound swab (69), blood (26), nasal/throat swab (11), eye swab (10), tracheal aspiration (4), bile (3), catheter tip (3), tracheostomy tube (2), vaginal swab (1). Of 129 strains tested, 47 were HA-MRSA, showing resistance to at least one glycopeptide antibiotic (MRSA/GRSA) and 8 HA-MRSA strains expressing various levels of a reduced vancomycin-susceptible phenotype (MRSA/h-VISA). As a reference group, 55 clinical HA-MRSA glycopeptide-susceptible isolates (MRSA/VSSA) and 19 strains susceptible to both methicillin and vancomycin (MSSA/VSSA) were used.

All strains were identified using the VITEK II automated system (Biomérieux, France) with GP cards, according to the manufacturer's instructions. Susceptibility to methicillin was determined on the basis of the oxacillin/cefoxitin phenotype test (OX 1/2 µg, FOX 30 µg, Oxoid), in accordance with the applicable CLSI/EUCAST recommendations. The presence of the *mecA* gene was confirmed using PCR and the relevant primer pairs: *MecA-R* and *MecA-F* (10). Susceptibility to glycopeptides was determined using the E-test (Biomérieux), VAN and TEI tests (AB

niewpowodzeniem (5, 6). Najprawdopodobniej, oprócz zmian w strukturze i grubości peptydoglikanu u tych szczepów, istotną rolę w wyrażeniu fenotypu oporności na glikopeptydy, odgrywają zaburzenia procesów autolitycznych (6, 7, 8). Zmniejszona wrażliwość na wankomycynę wynikająca z powyższego mechanizmu, może stanowić istotny czynnik predysponujący szczepy do wytwarzania biofilmu. Wydaje się ponadto, że istotny wpływ na zdolność do wytwarzania biofilmu przez *S. aureus*, może mieć dostępność tlenu, która wiąże się z lokalizacją zakażenia (9).

W niniejszej pracy podjęto badania, których celem była ocena zdolności do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu w warunkach zróżnicowanej dostępności tlenu przez kliniczne izolaty HA-MRSA (health-care associated MRSA), nie-wrażliwe na glikopeptydy. Ponadto uzyskane wyniki porównano z analogicznymi, otrzymanymi dla szczepów: MRSA, wrażliwych na wankomycynę (vancomycin susceptible *S. aureus*, VSSA) oraz wrażliwych zarówno na metycylinę (methicillin susceptible *S. aureus*, MSSA), jak i wankomycynę (VSSA).

MATERIAŁY I METODY

Charakterystyka szczepów bakteryjnych

Analizie poddanych zostało łącznie 129 klinicznych izolatów *Staphylococcus aureus*, pochodzących od pacjentów z 12 oddziałów: chirurgicznych (34), neonatologicznych (26), ortopedycznych (19), OIT (13), dermatologicznych (13), hematologicznych (9), onkologicznych (4), transplantologicznych (4), ginekologicznych (3), internistycznych (2), okulistycznego (1) oraz endokrynologicznego (1), pochodzących z trzech dużych warszawskich ośrodków klinicznych. Szczepy izolowane były z następujących materiałów klinicznych: wymaz z rany (69), krew (26), wymaz z nosa/gardła (11), wymaz z oka (10), aspirat tchawiczy (4), żółć (3), końcówka cewnika (3), rurka tracheostomijna (2), wymaz z pochwy (1). Wśród badanych 129 szczepów, było 47 HA-MRSA wykazujących oporność na przynajmniej jeden antybiotyk glikopeptydowy (MRSA/GRSA) oraz 8 szczepów HA-MRSA, wyrażających fenotyp obniżonej wrażliwości na wankomycynę na zróżnicowanym poziomie (MRSA/h-VISA). Jako grupę odniesienia zastosowano 55 klinicznych izolatów HA-MRSA wrażliwych na glikopeptydy (MRSA/VSSA) oraz 19 szczepów wrażliwych zarówno na metycylinę, jak i wankomycynę (MSSA/VSSA).

Wszystkie badane szczepy zidentyfikowano przy zastosowaniu automatycznego systemu VITEK II, (Biomérieux, Francja) z wykorzystaniem kart GP, zgodnie z instrukcją producenta. Wrażliwość na metycylinę określano na podstawie testu fenotypowego z oksacyliną/cefoksytyną (OX 1/2 µg, FOX 30 µg, Oxoid), zgod-

Biodisc) and GRD E-test (Biomerieux). The results were interpreted in accordance with the EUCAST recommendations (11). *S. aureus* strains resistant to at least one glycopeptide antibiotic (vancomycin and/or teicoplanin) were selected according to the methodology described by Szymanek-Majchrzak et al. (12). The h-VISA strains were selected based on the results of PAP population analysis, according to the procedure described by Hiramatsu and its modification by Wootton and Howe (13). The presence of glycopeptide antibiotic resistance genes was verified using PCR and the appropriate primer pairs: VanA-1 and VanA-2 and VanB-1 and VanB-2 (14).

Determination of strains' ability to produce extracellular mucopolysaccharide and biofilm

S. aureus ATCC 29213 and *S. epidermidis* ATCC 35984 reference strains were used as positive controls for the evaluation of mucus and biofilm production.

Freeman's qualitative method

Determination of strains' ability to produce extracellular mucopolysaccharide was performed on medium with Congo red (CRA), according to Freeman's method and its modification (15). A single colony was inoculated on two identical TSA (Biomerieux) media with sucrose (POCH) (50 g/l) and Congo red (Sigma-Aldrich) (0.8 g/l), and then one of the plates was incubated under aerobic conditions for 24 hours at 37°C, while the other under anaerobic conditions (24 hours, 37°C). The morphology of culture colonies conducted under aerobic conditions was assessed after one day of incubation. The incubation was prolonged for 24 hours at 37°C due to the poor growth of microorganisms under anaerobic conditions within one day, and the final reading was made after 48 hours. A 1-4 scale was used to evaluate differences in the color of microorganisms colonies grown on the medium with Congo red. Strains showing the ability to produce extracellular mucus grew in the form of black matt colonies, causing additional darkening of the medium (strong mucopolysaccharide producer, SMP – 4) or brown colonies and brown colonies with black tips that also caused the darkening of the substrate (intermediate mucopolysaccharide producer, IMMP – 3). Strains with poor ability to produce extracellular substances (weak mucopolysaccharide producer, WMP – 2) grew in the form of light brown colonies with black tips and changed the color of the medium to darker, while microorganisms not producing mucopolysaccharide (non-mucopolysaccharide producer, NMP – 1) in the form of red colonies without changing the color of the medium.

nie z obowiązującymi rekomendacjami CLSI/EUCAST. Obecność genu *mecA* potwierdzano przy zastosowaniu techniki PCR oraz odpowiednich par starterów: MecA-R i MecA-F (10). Wrażliwość na glikopeptydy oznaczano przy zastosowaniu E-testu (Biomerieux) VAN i TEI (AB Biodisc) oraz E-testu GRD (Biomerieux). Wyniki interpretowano zgodnie z rekomendacjami EUCAST (11). Szczepy *S. aureus* odporne na przynajmniej jeden antybiotyk glikopeptydowy (wankomycynę i/lub teikoplaninę) selekcjonowano zgodnie z metodyką opisaną przez Szymanek-Majchrzak i wsp. (12). Szczepy h-VISA selekcjonowano na podstawie wyników analizy populacyjnej PAP, według procedury opisanej przez Hiramatsu oraz jej modyfikacji wg Wootton i Howe (13). Obecność genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe weryfikowano przy użyciu techniki PCR oraz odpowiednich par starterów: VanA-1 i VanA-2 oraz VanB-1 i VanB-2 (14).

Oznaczanie zdolności szczepów do wytwarzania zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu

W badaniu oceny produkcji śluzu oraz biofilmu, jako kontrole pozytywne zostały wykorzystane szczepy wzorcowe: *S. aureus* ATCC 29213 oraz *S. epidermidis* ATCC 35984.

Metoda jakościowa wg Freeman'a

Oznaczenie zdolności szczepów do wytwarzania zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu przeprowadzono na podłożu z dodatkiem czerwieni kongo (CRA), według metody Freeman'a oraz jej modyfikacji (15). Pojedynczą kolonię posiewano na dwa jednakowe podłoża TSA (Biomerieux) z dodatkiem sacharozy (POCH) (50 g/l) oraz czerwieni kongo (Sigma-Aldrich) (0.8 g/l), a następnie jedno z podłoży inkubowano w warunkach tlenowych przez 24 godziny w temperaturze 37°C, drugie natomiast w warunkach beztlenowych (24 godziny, 37°C). Po dobie inkubacji oceniano morfologię kolonii hodowli prowadzonej w warunkach tlenowych. Ze względu na słaby wzrost drobnoustrojów w warunkach beztlenowych w czasie jednej doby, inkubację przedłużano o kolejne 24 godziny w 37°C i ostatecznego odczytu dokonywano po 48 godzinach. Zróżnicowanie zabarwienia kolonii drobnoustrojów rosnących na podłożu z czerwienią kongo oceniono, stosując skalę 1-4. Szczepy, wykazujące zdolność do produkcji śluzu zewnątrzkomórkowego, rosły w postaci czarnych matowych kolonii, powodując dodatkowo zaciemnienie podłoża (bardzo dobra zdolność do produkcji mukopolisacharydu – Strong Mucopolysaccharide Producer, SMP – 4) lub brunatnych kolonii i brunatnych kolonii z czarnymi czubkami, które również powodowały zaciemnienie podłoża

Christensen's semi-qualitative method

The semi-quantitative assessment of adhesion and biofilm production was performed according to Christensen's method and its modification (16). Bacterial suspensions were prepared from fresh cultures in a 0.85% NaCl solution with a density of 0.5 on the McFarland scale. The resulting suspensions were subsequently diluted in sterile TSB medium (Biomérieux) with 0.25% glucose at a ratio of 1:40 and 200 µl was applied to the wells in two 96-well flat-bottomed polystyrene plates in triplicate for each strain. A sterile TSB medium with 0.25% glucose without inoculum was the control of the medium sterility. One titration plate was incubated for 24 hours at 37°C in an aerobic atmosphere, the other – under anaerobic conditions (48 hours at 37°C). Then, each well was rinsed three times with sterile PBS buffer. The formed biofilm layer was stained with a 2% solution of crystal violet for 15 minutes and then rinsed several times with sterile distilled water until the water stopped staining. After this step, the titration plates were dried at 50°C for 1 hour, and then each well was filled with 96% ethanol. After 3 minutes, the absorbance was measured using a STAT FAX 2100 Microplate Reader spectrophotometer (Awareness Technology, Inc) at 630/492 nm. The average value was calculated for each test strain from the series of measurements, then the average OD (optical density) result obtained for the negative control was subtracted from this value. Strains for which the absorbance measurement result was: 1) lower than 0.120 were classified as non-slime producer (NSP); 2) ranging from 0.120-0.240 were classified as weak slime producer (WSP); 3) above 0.240 were determined as strong slime producer (SSP).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the assays are presented in Tables I, II, III and IV.

The Freeman Congo red method used in this study allows to assess the ability of bacterial strains to produce the extracellular PIA/PNSG mucopolysaccharide. MRSA strains displaying the non-susceptible phenotype to glycopeptide antibiotics (47 MRSA/GRSA and 8 MRSA/h-VISA), produced mucopolysaccharide under aerobic conditions with a frequency of 87.3% and 87.5% (Table I and III). The analogous results in control groups in the aerobic atmosphere were as follows: 83.6% for MRSA/VSSA and 100% MSSA/VSSA. Therefore, it seems that the thickened cell wall mechanism itself does not have a significant impact on the PIA/PNSG production level. However, the ability of *S. aureus* to produce extracellular mucopolysaccharide is an important

(średnia zdolność do produkcji mukopolisacharydu – Intermediate Mucopolysaccharide Producer, IMMP – 3). Szczepy o słabej zdolności do produkcji substancji zewnątrzkomórkowej (Weak Mucopolysaccharide Producer, WMP - 2) rosły w postaci jasnobrązowych kolonii z czarnymi czubkami i zmieniały zabarwienie podłoża na ciemniejsze, natomiast drobnoustroje nie wytwarzające mukopolisacharydu (Non Mucopolysaccharide Producer, NMP - 1) w postaci czerwonych kolonii, bez zmiany zabarwienia podłoża.

Metoda półilościowa wg Christensen'a

Ocenę półilościową zdolności do adhezji oraz produkcji biofilmu przeprowadzono według metody Christensen'a oraz jej modyfikacji (16). Ze świeżych hodowli przygotowywano zawiesiny bakteryjne w roztworze 0.85% NaCl, o gęstości 0.5 w skali McFarlanda. Następnie uzyskane zawiesiny rozcieńczano w jałowym podłożu TSB (Biomérieux) z dodatkiem 0.25% glukozy, w proporcji 1:40 i наносzono po 200µl do studzienek w dwóch 96-dółkowych płaskodennych płytkach polistyrenowych, w trzech powtórzeniach dla każdego szczepu. Kontrolę sterylności podłoża stanowiło jałowe podłoże TSB z 0.25% glukozy bez inokulum. Jedną płytkę titracyjną inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze tlenowej, drugą – w warunkach beztlenowych (48 godzin w 37°C). Następnie każdą studzienkę płukano trzykrotnie jałowym buforem PBS. Utworzoną warstwę biofilmu barwiono 2% roztworem fioletu krystalicznego przez 15 minut, a następnie płukano kilkakrotnie jałową wodą destylowaną, do momentu kiedy woda przestała się barwić. Po tym etapie płytki titracyjne suszono w temperaturze 50°C przez 1 godzinę, a następnie każdą studzienkę wypełniano 96% etanolem. Po upływie 3 minut dokonywano pomiaru absorbancji przy użyciu spektrofotometru STAT FAX 2100 Microplate Reader (Awareness Technology, Inc), przy długości fali 630/492 nm. Z serii pomiarów dla każdego badanego szczepu wyliczano wartość średnią, a następnie od tej wartości odejmowano średni wynik gęstości optycznej (OD, Optical Density), uzyskany dla kontroli ujemnej. Szczepy, dla których otrzymano wynik pomiaru absorbancji: 1) poniżej 0.120, klasyfikowano jako nie wykazujące zdolności do tworzenia biofilmu (NSP - Non Slime Producer); 2) mieszczący się w zakresie 0.120 – 0.240, klasyfikowano jako zdolne do tworzenia biofilmu na niskim poziomie (WSP – Weak Slime Producer); 3) powyżej 0.240, oznaczano jako zdolne do produkcji biofilmu na wysokim poziomie (SSP – Strong Slime Producer).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń przedstawiono w tabelach nr I, II, III oraz IV.

virulence factor, especially in bacterial strains lacking specific mechanisms of resistance to antibiotics (17, 18). The occurrence of microbial cells in the form of aggregates or micro colonies surrounded by the PIA/PNSG layer significantly impairs the penetration of the drug into the bacterial cell, which may result in the survival of the pathogen, and thus the failure of the antibiotic therapy. The ability to produce mucopolysaccharide and/or biofilm can be a more significant survival strategy for MSSA/VSSA variants than for MRSA variants (both MRSA/VSSA, MRSA/h-VISA and MRSA/GRSA), for which the primary survival strategy is a specific resistance mechanism to beta-lactam antibiotics associated with the presence of the *mecA* or *mecC* genes and the so-called SCC*mec* staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (17). The mere presence of both genes in the cell: physiological *pbp2* and *mecA* or *mecC* leads to the increased content of PBP2 and PBP2a proteins in the peptidoglycan, which results in disturbances of the cell wall structure and can lead to clusters of bacterial cells in the form of aggregates or micro colonies. Moreover, there is an additional *psm-mec* coding sequence in cassettes of some types, especially SCC*mec* type II, found in HA-MRSA variants (19). The transcription product of this region, *psm-mec* mRNA, can act as an inhibitor of the global Agr regulatory expression system (at the translation initiation stage), leading to the switch of the toxin-producing phenotype to the highly adherent phenotype of the strains. The direct effect of such action may be an increased ability of bacterial isolate to produce a three-dimensional biostructure in the so-called *ica*-independent mechanism. Some types of SCC*mec* cassettes, in addition to the *mec* gene complex, can also encode other determinants, such as the *cap1* gene, which determines the ability of the strain to produce the capsule, thanks to which the extracellular matrix production trait is expressed at a higher level (20). This is confirmed by the obtained results of analyses, according to which none of MSSA strains showed the SMP trait, whereas MRSA variants (MRSA/VSSA, MRSA/GRSA and MRSA/h-VISA) at 6.5%, 12.2% and 28.6%, respectively. The highest percentage of SMP variants in the pool of biofilm-positive strains was recorded among MRSA isolates not susceptible to glycopeptides, which is most probably associated with the presence of the thickened cell wall phenotype, increased peptidoglycan crosslinking, increased content of free D-alanyl-D-alanine dipeptides in the network as well as autolytic processes disorders in the murein. These modifications may promote the formation of a thick, amorphous cell wall, and thus enhance the process of three-dimensional biostructure formation (6).

Zastosowana w niniejszym opracowaniu metoda z czerwienią kongo wg Freeman'a umożliwia ocenę zdolności szczepów bakteryjnych do wytwarzania zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu PIA/PNSG. Szczepy MRSA wykazujące fenotyp braku wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe (47 MRSA/GRSA oraz 8 MRSA/h-VISA), produkowały mukopolisacharyd w warunkach tlenowych z częstością 87.3% i 87.5% (Tabela I i III). W grupach kontrolnych w atmosferze tlenowej analogiczne wyniki były następujące: 83.6% dla MRSA/VSSA i 100% MSSA/VSSA. Wydaje się zatem, iż sam mechanizm pogrubionej ściany komórkowej nie ma znaczącego wpływu na poziom produkcji PIA/PNSG. Jednak zdolność do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu stanowi u *S. aureus* istotny czynnik zjadliwości, szczególnie u szczepów bakteryjnych pozbawionych specyficznych mechanizmów oporności na antybiotyki (17, 18). Występowanie komórek drobnoustroju w postaci agregatów, czy mikrokolonii otoczonych warstwą PIA/PNSG znacznie utrudnia penetrację leku do wnętrza komórki bakteryjnej, co może skutkować przeżyciem patogenu, a tym samym niepowodzeniem zastosowanej antybiotykoterapii. Zdolność do wytwarzania mukopolisacharydu i/ lub biofilmu może u wariantów MSSA/VSSA stanowić bardziej istotną strategię przetrwania niż dla wariantów MRSA (zarówno MRSA/VSSA, MRSA/h-VISA, jak i MRSA/GRSA), dla których zasadniczą strategię przetrwania stanowi specyficzny mechanizm oporności na antybiotyki beta-laktamowe, związany z obecnością genu *mecA* lub *mecC* oraz tzw. gronkowcowych kaset chromosomowych SCC*mec* (17). Już sama obecność w komórce obydwu genów: fizjologicznego *pbp2* oraz *mecA* lub *mecC* prowadzi do obecności w peptydoglikanie podwyższonej zawartości białek PBP2 oraz PBP2a, co skutkuje zaburzeniami struktury ściany komórkowej i może prowadzić do powstawania skupisk komórek bakteryjnych w postaci agregatów lub mikrokolonii. Ponadto na kasetach niektórych typów, szczególnie SCC*mec* typu II, występujących u wariantów HA-MRSA, znajduje się dodatkowo sekwencja kodująca *psm-mec* (19). Produkt transkrypcji tego regionu, mRNA *psm-mec* może pełnić rolę inhibitora ekspresji globalnego systemu regulacyjnego Agr (na etapie inicjacji translacji), prowadząc do przełączenia fenotypu toksyno-twórczego szczepów na fenotyp wysoce adhe rentny. Bezpośrednim efektem takiego działania może być podwyższenie zdolności izolatu bakteryjnego do produkcji trójwymiarowej biostruktury w mechanizmie tzw. *ica*- niezależnym. Na kasetach SCC*mec* niektórych typów, oprócz kompleksu genu *mec* mogą być kodowane również inne determinanty jak np.: gen *cap1*, warunkujący zdolność szczepu do wytwarzania otoczki, dzięki którym cecha produkcji macierzy zewnątrzkomórkowej wyraża się na wyższym poziomie (20).

Table I The ability of *S. aureus* strains with different antibiotic resistance phenotypes for the production of extracellular mucopolysaccharide, determined by Freeman's method, under aerobic and anaerobic conditionsTabela I Zdolność szczepów *S. aureus* o różnych fenotypach oporności na antybiotyki do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oznaczana metodą Freeman'a, w warunkach tlenowych i beztlenowych

Results of analysis	Freeman's method							
	Antibiotic resistance phenotype of analysed <i>S. aureus</i> strains							
	MRSA/GRSA, n=47 number of strains (%)		MRSA/h-VISA, n=8 number of strains (%)		MRSA/VSSA, n=55 number of strains (%)		MSSA/VSSA, n=19 number of strains (%)	
	+ O ₂	- O ₂	+ O ₂	- O ₂	+ O ₂	- O ₂	+ O ₂	- O ₂
NMP	6 (12.7)	0 (0)	1 (12.5)	0 (0)	9 (16.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
WMP	15 (32)	0 (0)	3 (37.5)	1 (12.5)	20 (36.4)	1 (1.8)	11 (57.9)	0 (0)
IMMP	21 (44.7)	22 (46.8)	2 (25)	1 (12.5)	23 (41.8)	17 (31)	8 (42.1)	16 (84.2)
SMP	5 (10.6)	25 (53.2)	2 (25)	6 (75)	3 (5.4)	37 (67.2)	0 (0)	3 (15.8)
MP (total)	41/47 (87.3)	47/47 (100)	7/8 (87.5)	8/8 (100)	46/55(83.6)	55/55 (100)	19/19 (100)	19/19 (100)
SMP/MP	5/41 (12.2)	25/47 (53)	2/7 (28.6)	6/8 (75)	3/46 (6.5)	37/55 (67.2)	0/19 (0)	3/19 (15.8)

Legend: NMP – non mucopolysaccharide producer, WMP – weak mucopolysaccharide producer, IMMP – intermediate mucopolysaccharide producer, SMP – strong mucopolysaccharide producer, MP – mucopolysaccharide producer

Oznaczenia: NMP – brak produkcji mukopolisacharydu (Non Mucopolysaccharide Producer), WMP – niski poziom produkcji mukopolisacharydu (Weak Mucopolysaccharide Producer), IMMP – średni poziom produkcji mukopolisacharydu (Intermediate Mucopolysaccharide Producer), SMP – wysoki poziom produkcji mukopolisacharydu (Strong Mucopolysaccharide Producer), MP – produkcja mukopolisacharydu (Mucopolysaccharide Producer)

In the anaerobic atmosphere, all analyzed *S. aureus* variants exhibited the MP phenotype and an increase in the ability to produce extracellular mucopolysaccharide was observed in all isolates in comparison to aerobic conditions (increase from 2.6- to 15.8-fold) (Table I, III and IV). The highest percentage of SMP variants was recorded among MRSA/h-VISA strains (75%), while the lowest in MSSA/VSSA susceptible isolates (15.8%). In turn, the level of change of this trait in anaerobic conditions compared to aerobic was the highest in Freeman's method for MSSA/VSSA variants (15.8-fold), and the lowest for MRSA/h-VISA isolates (2.6-fold). The *ica*ABCD operon is responsible in *S. aureus* for the ability to produce extracellular mucus. Numerous literature data suggest that 100% of *Staphylococcus aureus* strains contain *ica* genes, but the induction and level of phenotype expression varies and depends on many factors, including environmental conditions (temperature, pH, osmolarity, glucose and oxygen availability) and global and local intracellular regulatory mechanisms. These include: two-component "quorum sensing" system (AgrABCD, *ArlR/S*, *SrrA/B*) as well as transcription factors, e.g.: *SarA*, *SarX*, *SarR*, *SarZ*, *SigB*, *Rbf*, *IcaR* or *TcaR*. They form a complex network of intracellular interactions consisting in the activation or repression of gene expression leading to the expression of the phenotype, which is the resultant of all these mechanisms and factors (21, 22, 23, 24). For example, conditions of oxidative stress lead to the activation of *sigB* gene expression of the Sigma B factor, which is a direct activator of the *icaA* gene transcription and simultaneously the repressor of *icaR* gene expression.

Potwierdzają to uzyskane wyniki analiz, według których żaden ze szczepów MSSA nie wykazywał cechy SMP, natomiast warianty MRSA (MRSA/VSSA, MRSA/GRSA oraz MRSA/h-VISA), odpowiednio na poziomie 6.5%, 12.2% oraz 28.6%. Największy odsetek wariantów SMP w puli szczepów biofilm-pozytywnych odnotowano wśród izolatów MRSA nie-wrażliwych na glikopeptydy, co najprawdopodobniej związane jest z występowaniem fenotypu pogrubionej ściany komórkowej, zwiększonego usieciowania peptydoglikanu, zwiększonej zawartości w sieci wolnych dipeptydów D-alanylo-D-alaninowych, jak również zaburzeń procesów autolitycznych w obrębie mureiny. Modyfikacje te mogą sprzyjać powstawaniu grubej, amorficznej ściany komórkowej, a tym samym nasilać proces formowania trójwymiarowej biostruktury (6).

W atmosferze beztlenowej wszystkie analizowane warianty *S. aureus* wykazywały fenotyp MP i u wszystkich izolatów zaobserwowano wzrost zdolności do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu w porównaniu do warunków tlenowych (wzrost od 2.6- do 15.8- krotny) (Tabela I, III i IV). Najwyższy odsetek wariantów SMP odnotowano wśród szczepów MRSA/h-VISA (75%), natomiast najniższy u izolatów wrażliwych MSSA/VSSA (15.8%). Z kolei poziom zmiany tej cechy w warunkach anaerobowych w porównaniu z aerobowymi, w metodzie Freeman'a, był najwyższy dla wariantów MSSA/VSSA (15.8- krotny), a najniższy dla izolatów MRSA/h-VISA (2.6- krotny). U *S. aureus* za zdolność do produkcji śluzu zewnątrzkomórkowego odpowiedzialny jest operon *ica*ABCD. Liczne dane literaturowe sugerują, że 100% szczepów gronkowca złocistego zawiera geny *ica*, ale induk-

The effect of *sigB* induction is the increase of the strain's ability to produce PIA/PNSG (22). The *SrrA/B* system, activated by anaerobic conditions, leads to the inhibition of P2 and P3 promoter expression of the *Agr* regulatory system, whose indirect effect is the switching of the bacterial strain toxin-producing phenotype to the adhesion phenotype, i.e., biofilm-positive (24). Literature data suggest that *S. aureus* strains, non-susceptible to vancomycin in the thickened cell wall mechanism (h-VISA), are defective in the *Agr* system, which may explain the lowest susceptibility of this phenotype to oxidative stress conditions (25). In turn, the *ica* operon-dependent mechanism, which dominates in MSSA/VSSA, shows greater susceptibility to anaerobic conditions compared to the *ica*-independent (adhesive) mechanisms (18).

The Christensen method with crystalline violet used in this study allows semi-quantitative evaluation of the ability of bacterial strains to adhere to the polystyrene surface. Therefore, it seems that the obtained results should be more reliable for both the mechanism dependent on the *ica* genes and for the mechanism of adherent biofilm formation *in vitro*, and the determined phenotype is a resultant of both mechanisms.

cja oraz poziom ekspresji fenotypu jest zróżnicowany i uzależniony wielu czynników, w tym od warunków środowiskowych (temperatura, pH, osmolarność, dostępność glukozy, dostępność tlenu) oraz globalnych i lokalnych wewnątrzkomórkowych mechanizmów regulacyjnych. Zaliczyć do nich można m.in.: układy dwuskładnikowe „quorum sensing” (*AgrABCD*, *ArlR/S*, *SrrA/B*), jak również czynniki transkrypcyjne, np.: *SarA*, *SarX*, *SarR*, *SarZ*, *SigB*, *Rbf*, *IcaR* czy *TcaR*. Tworzą one złożoną sieć wewnątrzkomórkowych zależności, polegających na aktywacji bądź represji ekspresji genów, prowadzących do wyrażenia fenotypu, będącego wypadkową działania tych wszystkich mechanizmów oraz czynników (21, 22, 23, 24). Na przykład warunki stresu oksydacyjnego prowadzą do aktywacji ekspresji genu *sigB* czynnika Sigma B, który jest bezpośrednim aktywatorem transkrypcji genu *icaA* i jednocześnie represorem ekspresji genu *icaR*. Efektem indukcji *sigB* jest wzrost zdolności szczepu do produkcji PIA/PNSG (22). Z kolei aktywowany warunkami beztlenowymi system *SrrA/B*, prowadzi do zahamowania ekspresji promotora P2 i P3 systemu regulacyjnego *Agr*, czego pośrednim skutkiem jest przełączenie fenotypu toksyno-twórczego szczepu bakteryjnego na fenotyp adhezyjny, czyli biofilm-pozytywny (24).

Table II The ability of *S. aureus* strains with different antibiotic resistance phenotypes for the production of biofilm, determined by Christensen's method, under aerobic and anaerobic conditions

Tabela II Zdolność szczepów *S. aureus* o różnych fenotypach oporności na antybiotyki do produkcji biofilmu oznaczanego metodą Christensen'a, w warunkach tlenowych i beztlenowych

Results of analysis	Christensen's method							
	Antibiotic resistance phenotype of analysed <i>S. aureus</i> strains							
	MRSA/GRSA, n=47 number of strains (%)		MRSA/h-VISA, n=8 number of strains (%)		MRSA/VSSA, n=55 number of strains (%)		MSSA/VSSA, n=19 number of strains (%)	
	+ O ₂	- O ₂	+ O ₂	- O ₂	+ O ₂	- O ₂	+ O ₂	- O ₂
NSP	17 (36.2)	33 (70.2)	3 (37.5)	6 (75)	11 (20)	35 (63.6)	1 (5.3)	14 (73.7)
WSP	21 (44.7)	14 (29.8)	2 (25)	2 (25)	24 (43.7)	15 (27.3)	8 (42)	4 (21)
SSP	9 (19.1)	0 (0)	3 (37.5)	0 (0)	20 (36.3)	5 (9.1)	10 (52.7)	1 (5.3)
SP (total)	30/47 (63.9)	14/47 (29.8)	5/8 (62.5)	2/8 (25)	44/55 (80)	20/55 (36.4)	18/19 (94.7)	5/19 (26.3)
SSP/SP	9/30 (30)	0/14 (0)	3/5 (60)	0/2 (0)	20/44 (45.4)	5/20 (25)	10/18 (55.5)	1/5 (20)

Legend: NSP – non slime producer, WSP – week slime producer, SSP – strong slime producer, SP – slime producer

Oznaczenia: NSP – brak produkcji biofilmu (Non Slime Producer), WSP – niski poziom produkcji biofilmu (Week Slime Producer), SSP – wysoki poziom produkcji biofilmu (Strong Slime Producer), SP – produkcja biofilmu (Slime Producer)

Positive results obtained in this method for strains exhibiting the non-susceptible phenotype to glycopeptide antibiotics (MRSA/GRSA and MRSA/h-VISA) were 63.9% and 62.5%, respectively, under aerobic conditions, while in the control groups: 80% for MRSA/VSSA and 94.7% for MSSA/VSSA (Table II and III), which gave lower values for biofilm production compared to those obtained by Freeman's method for mucopolysaccharide production. However, similarly to the method with Congo

Dane literaturowe sugerują, że szczepy *S. aureus* nie-wrażliwe na wankomycynę w mechanizmie pogrubionej ściany komórkowej (h-VISA) są defektywne w systemie *Agr*, co może tłumaczyć najniższą wrażliwość tego fenotypu na warunki stresu oksydacyjnego (25). Z kolei mechanizm zależny od operonu *ica*, który dominuje u MSSA/VSSA, wykazuje większą wrażliwość na warunki beztlenowe w porównaniu z mechanizmami *ica*-niezależnymi (adhezyjnymi) (18).

red, it has been shown that the ability to form biofilm plays the most important role in MSSA/VSSA strains, i.e., lacking specific antibiotic resistance mechanisms (17). SSP variants were present in all analyzed strain pools and their proportion in the pool of biofilm-positive strains ranged from 30 to 60%, and these results were higher than those obtained for the same isolates in the Congo red plate method. This may be related to the compilation of the effects of the two mechanisms of biofilm formation. Freeman's method evaluated only the ability to produce mucopolysaccharide and the possibility of *ica*-dependent mechanism occurrence in biofilm formation, which did not always lead to biofilm formation (17, 18). Christensen's method determined the actual frequency of biofilm formation. It is possible to observe here the enhancement of the effect of biostructure formation called "biofilm booster effect" (it concerns the participation of SSP variants in the SP pool), most likely by the effect of the mechanism associated with the production of adhesive proteins from the MSCRAMM family (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule), SasG proteins, Bap proteins, polysaccharide capsules and with eDNA release (1). However, this effect is less spectacular in the case of methicillin-resistant variants (MRSA/GRSA, MRSA/h-VISA and MRSA/VSSA) compared to MSSA.

The results obtained in Christensen's method under conditions of oxidative stress significantly differed from the expected ones. The percentage of SP variants in *S. aureus* strains non-susceptible to vancomycin was: 29.8% for MRSA/GRSA and 25% for MRSA/h-VISA and none of these isolates exhibited high biofilm production capacity. The proportion of vancomycin-susceptible strains able to produce biostructure was only 36.4% for MRSA/VSSA and 26.3% for MSSA/VSSA variants (Table II and IV). Decreases in the proportion of biofilm-positive strains (from 2.1- to 3.6-fold) were observed in all cases in this method in comparison to the results obtained in aerobic conditions. As high as 30- and 60-fold decreases in the percentage of strains able to produce biofilm at high SSP/SP level were noted for MRSA/GRSA and MRSA/h-VISA isolates. According to literature reports, anaerobic conditions intensify biofilm formation processes both in the *ica*-dependent mechanism as well as that one not associated with *ica*. In the anaerobic atmosphere, SarA and Sigma B transcription factors are activated, as well as the two-component ArlR/S and SrrA/B regulation systems, which through direct positive regulation of the *ica*ABCD operon and indirect negative regulation of the global Agr regulatory system, lead to the occurrence of the "biofilm booster effect" (4, 9, 21, 24). Perhaps in this study, the "booster effect" determined by oxidative stress caused that biofilms entered another natural stage of development, i.e., dispersion (2). The biofilm structure could be compromised or even removed during routine testing procedure as a consequence of covalent bond

Zastosowana w niniejszym opracowaniu metoda z fioletem krystalicznym wg Christensen'a umożliwia ilościową ocenę zdolności szczepów bakteryjnych do adhezji na powierzchni polistyrenowej. Wydaje się zatem, iż uzyskane wyniki powinny być bardziej miarodajne zarówno dla mechanizmu zależnego od genów *ica*, jak i dla mechanizmu adherentnego tworzenia biofilmu w warunkach *in vitro*, a oznaczony fenotyp jest wypadkową działania obydwu mechanizmów.

Dodatkowo wyniki uzyskane w tej metodzie dla szczepów wykazujących fenotyp braku wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe (MRSA/GRSA oraz MRSA/h-VISA) wynosiły, w warunkach tlenowych 63.9% i 62.5%, natomiast w grupach kontrolnych odpowiednio: 80% dla MRSA/VSSA i 94.7% MSSA/VSSA (Tabela II i III), co daje wartości niższe dla produkcji biofilmu od uzyskanych w metodzie Freeman'a dla produkcji mukopolisacharydu. Podobnie jednak, jak w metodzie z czerwienią kongo wykazano, że zdolność do formowania biofilmu największą rolę odgrywa w przypadku szczepów MSSA/VSSA, czyli pozbawionych specyficznych mechanizmów oporności na antybiotyki (17). W każdej analizowanej puli szczepów występowały warianty SSP, a ich udział w puli szczepów biofilm-pozytywnych mieścił się w zakresie 30 – 60% i są to wyniki wyższe od uzyskanych dla tych samych izolatów w metodzie płytkowej z czerwienią kongo. Może to być związane z kompilacją efektów działania obydwu mechanizmów tworzenia biofilmu. W metodzie Freeman'a oceniano jedynie zdolność wytwarzania mukopolisacharydu i możliwość wystąpienia mechanizmu *ica*-zależnego w tworzeniu biofilmu, który nie zawsze prowadzi do powstania biofilmu (17, 18). W metodzie Christensen'a ustalono faktyczną częstość tworzenia biofilmu. Daje się tu zaobserwować wzmocnienie efektu tworzenia biostruktury tzw. „biofilm booster effect” (dotyczy to udziału wariantów SSP w puli SP), najprawdopodobniej o efekt mechanizmu związanego z produkcją białek adhezyjnych z rodziny MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule), białka SasG, Bap, otoczki polisacharydowej oraz z uwalnianiem eDNA (1). Przy czym w przypadku wariantów opornych na metycylinę (MRSA/GRSA, MRSA/h-VISA oraz MRSA/VSSA), w porównaniu do MSSA, efekt ten jest mniej spektakularny.

Wyniki uzyskane w metodzie Christensen'a w warunkach stresu oksydacyjnego znacząco odbiegały od oczekiwanych. W przypadku szczepów *S. aureus* nie-wrażliwych na wankomycynę odsetek wariantów SP wyniósł: 29.8% dla MRSA/GRSA oraz 25% dla MRSA/h-VISA i żaden z tych izolatów nie wykazywał zdolności do produkcji biofilmu na wysokim poziomie. W przypadku szczepów wrażliwych na wankomycynę, udział zdolnych do wytworzenia biostruktury wyniósł jedynie 36.4% spośród wariantów MRSA/VSSA i 26.3%

hydrolysis and the release of microbial cells into the planktonic form. However, it should be noted that the time of generation between individual cell divisions is extended under oxidative stress conditions. Thus, too short a time of incubation of the bacterial culture during the tests could be insufficient to form a permanent, mature biofilm structure and also lead to its removal during the experiment (4). According to Christensen's method, it is not possible, based on the results obtained in an anaerobic atmosphere, to explain such low values of the test readings.

spośród MSSA/VSSA (Tabela II i IV). We wszystkich przypadkach odnotowano spadki udziału szczepów biofilm-pozytywnych (od 2.1- do 3.6- krotne) w tej metodzie w porównaniu z wynikami uzyskanymi w warunkach tlenowych. W przypadku izolatów MRSA/GRSA i MRSA/h-VISA odnotowano aż 30- i 60- krotny spadek odsetka szczepów wykazujących zdolność do produkcji biofilmu na wysokim poziomie SSP/SP. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi warunki anaerobowe nasilają procesy formowania biofilmu, zarówno w przypadku mechanizmu *ica*- zależnego, jak i nie związanego z *ica*.

Table III The ability of *S. aureus* strains to produce extracellular mucopolysaccharide and biofilm under aerobic conditions
Tabela III Zdolność szczepów *S. aureus* do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu w warunkach tlenowych

Ability for production of slime/biofilm	Aerobic conditions							
	Freeman's method				Christensen's method			
	MRSA/GRSA (%)	MRSA/h-VISA (%)	MRSA/VSSA (%)	MSSA/VSSA (%)	MRSA/GRSA (%)	MRSA/h-VISA (%)	MRSA/VSSA (%)	MSSA/VSSA (%)
NMP/NSP	12.7	12.5	16.4	0	36.2	37.5	20	5.3
MP/SP	87.3	87.5	83.6	100	63.9	62.5	80	94.7
SMP/SSP	12.2	28.6	6.5	0	30	60	45.4	55.5

Legend the same as under table I i II

Oznaczenia jak pod tabelą I i II

Table IV The ability of *S. aureus* strains to produce extracellular mucopolysaccharide and biofilm under anaerobic conditions
Tabela IV Zdolność szczepów *S. aureus* do produkcji zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu oraz biofilmu w warunkach beztlenowych

Ability for production of slime/biofilm	Anaerobic conditions							
	Freeman's method				Christensen's method			
	MRSA/GRSA (%)	MRSA/h-VISA (%)	MRSA/VSSA (%)	MSSA/VSSA (%)	MRSA/GRSA (%)	MRSA/h-VISA (%)	MRSA/VSSA (%)	MSSA/VSSA (%)
NMP/NSP	0	0	0	0	70.2	75	63.6	73.7
MP/SP	100	100	100	100	29.8	25	36.4	26.3
SMP/SSP	53	75	67.2	15.8	0	0	25	20

Legend the same as under table I i II

Oznaczenia jak pod tabelą I i II

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In summary, it can be concluded based on the results obtained in the study that the analyzed HA-MRSA strains, exhibiting the non-susceptible phenotype to glycopeptide antibiotics, have an increased ability to produce both extracellular mucopolysaccharide and biofilm (SMP/SSP). It is most probably related to the disorders of the structure and function of the cell wall peptidoglycan and the defect of the global Agr regulatory system. The SMP/SSP trait is expressed primarily in the *ica*-independent mechanism and shows lower sensitivity to oxidative stress conditions compared to *S. aureus* strains susceptible to both

W atmosferze beztlenowej ulegają bowiem aktywacji czynniki transkrypcyjne SarA oraz Sigma B, jak również dwu-składnikowe systemy regulacyjne ArlR/S i SrrA/B, które zarówno poprzez bezpośrednią pozytywną regulację operonu *ica*ABCD, jak i pośrednią negatywną regulację globalnego systemu regulacyjnego Agr, prowadzą do wystąpienia efektu „biofilm booster” (4, 9, 21, 24). Być może w niniejszym badaniach „efekt wzmocnienia” determinowany stresem oksydacyjnym spowodował, iż biofilm wszedł w kolejny naturalny etap rozwoju, czyli dyspersję (2). W konsekwencji hydrolizy wiązań kowalencyjnych oraz uwalniania komórek drobnoustroju do formy planktonowej, struktura biofilmu mogła zostać naruszona lub nawet usunięta

methicillin and vancomycin. The semi-quantitative Christensen method, used in the study, allows to assess both mechanisms of a three-dimensional biostructure formation, and the results obtained with this method enable observing the resultant phenotype in the “biofilm booster effect” mechanism.

REFERENCES

1. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW i in. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2011;2(5):445–59.
2. Guilhen C, Forestier C, Balestrino D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol Microbiol* 2017;105(2):188-210.
3. Herrmann M. Antimicrobial effects promoting biofilm formation and persistent disease: the role of a DNA-binding regulator, SarA, in staphylococcal endocarditis. *J Infect Dis* 2014;209(8):1153-5.
4. Kavanaugh JS, Horswill AR. Impact of Environmental Cues on Staphylococcal Quorum Sensing and Biofilm Development. *J Biol Chem* 2016;291(24):12556-64.
5. Abdelhady W, Bayer AS, Seidl K i in. Reduced vancomycin susceptibility in an *in vitro* catheter-related biofilm model correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(3):1447-54.
6. Szymanek-Majchrzak K, Młynarczyk A, Młynarczyk G. Oporność *Staphylococcus aureus* na glikopeptydy. *Postępy Mikrobiol* 2013;52(2):171-84.
7. Hsu CY, Lin MH, Chen CC i in. Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;63(2):236-47.
8. Sieradzki K, Tomasz A. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(2):527-33.
9. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001;69(6):4079–85.
10. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2155-61.
11. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, version v 2.0; 2017-07-11. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
12. Szymanek-Majchrzak K, Młynarczyk A, Młynarczyk G. Characteristics of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients of three teaching

w trakcie wykonywania rutynowych czynności podczas przeprowadzania procedury badania. Warto zwrócić jednak uwagę, iż w warunkach stresu oksydacyjnego wydłużeniu ulega czas generacji pomiędzy poszczególnymi podziałami komórkowymi. Zatem zbyt krótki czas inkubacji hodowli bakteryjnej podczas testów mógł być nie wystarczający do uformowania trwałej, dojrzałej struktury biofilmu i również doprowadzić do jego usunięcia podczas przeprowadzania badania (4). Na podstawie wyników, uzyskanych w atmosferze bez-tlenowej, według metody Christensen’a, nie jest możliwe rozstrzygnięcie o przyczynach uzyskania tak niskich wartości odczytów badania.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Podsumowując, na podstawie uzyskanych w pracy wyników można stwierdzić, że analizowane szczepy HA-MRSA, wykazujące fenotyp braku wrażliwości na antybiotyki glikopeptydowe, wykazują podwyższoną zdolność do produkcji zarówno zewnątrzkomórkowego mukopolisacharydu, jak i biofilmu (SMP/SSP). Związane jest to najprawdopodobniej z występowaniem zaburzeń struktury i funkcji peptydoglikanu ściany komórkowej oraz defektem globalnego systemu regulatorowego Agr. Cecha SMP/SSP wyraża się przede wszystkim w mechanizmie *ica*- niezależnym i wykazuje niższą wrażliwość na warunki stresu oksydacyjnego, w porównaniu do szczepów *S. aureus* wrażliwych zarówno na metycylinę, jak i wankomycynę. Zastosowana w pracy metoda półilościowa wg Christensen’a pozwala ocenić obydwa mechanizmy formowania trójwymiarowej biostruktury, a uzyskane w niej wyniki pozwalają zaobserwować fenotyp wypadkowy w mechanizmie „biofilm booster effect”.

hospitals in Warsaw, Poland. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;29(7):105.

13. Wootton M, Howe RA, Hillman R i in. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001;47(4):399-403. Erratum in: *J Antimicrob Chemother* 2001;48(1):161.
14. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:24-7.
15. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989;42(8): 872–74.
16. Christensen GD, Simpson W, Younger J i in. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22(6):996–1006.

17. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS i in. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;28(5):1.
18. O'Neill E, Pozzi C, Houston P i in. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1379–88.
19. Kaito C, Saito Y, Ikuo M i in. Mobile Genetic Element SCCmec-encoded *psm-mec* RNA Suppresses Translation of *agrA* and Attenuates MRSA Virulence. *PLoS Pathog* 2013;9(4):e1003269.
20. Luong TT, Ouyang S, Bush K, Lee CY. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *Bacteriol* 2002;184(13):3623-9.
21. Burgui S, Gil C, Solano C i in. A Systematic Evaluation of the Two-Component Systems Network Reveals That ArlRS Is a Key Regulator of Catheter Colonization by *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2018;7(9):342.
22. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR. Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun* 2009;77(4):1623-35.
23. Szymanek K, Młynarczyk A, Młynarczyk G. Systemy regulacyjne ekspresji genów u *Staphylococcus aureus*. *Postępy Mikrobiol* 2009;48(1):7–22.
24. Ulrich M, Bastian M, Cramton SE i in. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* 2007;65(5):1276-87.
25. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG Jr i in. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 49(7):2687-92.

Received: 17.10.2018

Accepted for publication: 7.11.2018

Otrzymano: 17.10.2018 r.

Zaakceptowano do publikacji: 17.11.2018 r.

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Ksenia Szymanek-Majchrzak,
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004
Warszawa, tel./fax: +48 22 628 27 39,
e-mail: ksenia.szymanek-majchrzak@wum.edu.pl