MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2009, 61: 33 - 40

Patrycja Zalas-Więcek[1], Eugenia Gospodarek[1], Katarzyna Piecyk[2]

WYTWARZANIE ŚLUZU POZAKOMÓRKOWEGO, A ADHEZJA PAŁECZEK *ESCHERICHIA COLI* DO POLISTYRENU

[1] Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
[2] Katedra Podstaw Teoretycznych Nauk Biomedycznych i Informatyki Medycznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik Zakładu: dr hab. *E. Gospodarek,* prof. UMK

Oceniono związek pomiędzy adhezją do polistyrenu pałeczek *E. coli* izolowanych z krwi i z moczu, a ich zdolnością wytwarzania śluzu pozakomórkowego. Szczepy nieadherujące do polistyrenu wytwarzały więcej materiału pozakomórkowego niż szczepy adherujące.

Pałeczki *E. coli* stanowią składnik fizjologicznej mikroflory układu pokarmowego ludzi i zwierząt. Niektóre z nich wykształciły szereg czynników wirulencji, umożliwiających im zasiedlanie różnych nisz ekologicznych i wywoływanie zakażeń o różnej lokalizacji. Te patogenne szczepy mają istotne znaczenie zarówno w zakażeniach pozaszpitalnych, jak i szpitalnych, w tym w zakażeniach związanych ze stosowaniem biomateriałów.

Adhezja bakterii do powierzchni sztucznych jest procesem złożonym, zależnym od wielu czynników fizycznych i chemicznych, m.in. od substancji wytwarzanych pozakomórkowo integralnie związanych z komórką bakteryjną, takich jak polisacharyd śluzu (2, 4, 5). Stąd, postanowiono ocenić, czy istnieje związek pomiędzy adhezją pałeczek *E. coli* do polistyrenu, polimeru używanego w badaniach nad adhezją drobnoustrojów, a zdolnością wytwarzania śluzu pozakomórkowego.

MATERIAŁ I METODY

M a t e r i a ł. Materiał do badań stanowiło 169 szczepów *E. coli* izolowanych w latach 2003-2006 w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego im. dr. A. Jurasza Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (SU CM UMK). Wybrano szczepy izolowane z moczu oraz z krwi, które pochodziły od chorych leczonych w klinikach i poradniach przyklinicznych SU CM UMK. Każdy izolat pochodził od innego chorego.

M e t o d y. W identyfikacji szczepów uwzględniano następujące cechy: morfologię kolonii na podłożu MacConkey Agar (Becton Dickinson), zdolność fermentacji laktozy,

wytrącanie dezoksycholanu sodu. Ponadto, wykorzystano podłoże z mocznikiem i L-tryptofanem (L-tryptofan 3 g/l, mocznik 2 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, czerwień krezolowa 0,2% r-r w 50% alkoholu etylowym, NaCl 5 g/l, pepton Difco 10 g/l, agar 20 g/l, H_2O destylowana) w celu potwierdzenia zdolności wytwarzania tryptofanazy (rozkład tryptofanu do indolu i alaniny) przy jednoczesnym wykluczeniu zdolności wytwarzania ureazy (hydroliza mocznika do amoniaku i CO_2). Badane szczepy wkłuwano w wyżej wymienione podłoże, hodowano 24 godziny w temperaturze 37˚C. Wynik odczytywano po dodaniu odczynnika Jamesa. Szczep identyfikowano jako *E. coli*, jeśli na powierzchni podłoża pojawiał się czerwony pierścień, co świadczyło o wytworzeniu indolu, a podłoże nie zmieniało zabarwienia na czerwone, co wskazywało na brak wytwarzania ureazy.

Dla szczepów laktozo-ujemnych przynależność gatunkową określano z użyciem kart do identyfikacji drobnoustrojów Gram-ujemnych (GNI+) (bioMérieux), które odczytywano przy użyciu automatycznego systemu VITEK (bioMérieux).

Ocena zdolności adhezji szczepów i dysocjatów *E. coli* do polistyrenu. Oceny adhezji pałeczek *E. coli* do polistyrenu dokonywano stosując metodę opisaną przez *Christensena i wsp.* (3) w modyfikacji własnej. Rozszerzono kryterium oceny adhezji, wprowadzając czterostopniowe (brak, słaba, średnia, silna) zamiast trzystopniowego kryterium (brak, słaba, silna).

Szczepy pałeczek *E. coli* inkubowano w bulionie mózgowo-sercowym (Brain Heart Infusion Broth, BHI, Becton Dickinson) oraz w bulionie tryptozowo-sojowym (Tryptic Soy Broth, TSB, Becton Dickinson), w temperaturze 37°C przez 20 godzin. Uzyskane hodowle odwirowywano przy 4500 RPM przez 10 minut, następnie przemywano dwukrotnie jałowym 0,01 M buforowanym roztworem fizjologicznym NaCl (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 7,2). Uzyskany osad rozcieńczano jałowym podłożem BHI lub TSB tak, aby uzyskać zawiesinę komórek bakteryjnych o gęstości 0,5 według skali MacFarlanda. Następnie do trzech kolejnych studzienek okrągłodennych, sterylnych, polistyrenowych płytek 96-dołkowych (Medlab) wprowadzano po 150 µl otrzymanej zawiesiny bakteryjnej. Hodowle bakteryjne inkubowano 20 godzin w temperaturze 37°C. Następnie je odpipetowywano, płytki przemywano trzykrotnie jałowym roztworem PBS o pH 7,2. Przyległe bakterie utrwalano 96% alkoholem etylowym (Polskie Odczynniki Chemiczne) przez minutę w temperaturze pokojowej, a następnie barwiono przez 5 minut roztworem fioletu krystalicznego. Nadmiar barwnika usuwano przez płukanie płytek wodą wodociągową, do uzyskania bezbarwnych popłuczyn. Płytki suszono w temperaturze pokojowej, a następnie odczytywano gęstość optyczną (Optical Density, OD) w wielodetekcyjnym czytniku mikropłytek Synergy HT (BIO-TEK) przy długości fali $\lambda = 570$ nm. Próbę zerową stanowiło podłoże BHI i TSB. Wyniki pomiarów z trzech studzienek uśredniano.

W stosunku do badanych szczepów *E. coli* zastosowano następujące kryteria adhezji:

- dla szczepów inkubowanych w podłożu BHI: brak adhezji – OD ≤ 0,087 (wartość 0,087 uzyskano powiększając wartość średnią dla próby kontrolnej, jaką stanowiło podłoże BHI, o trzykrotne odchylenie standardowe tej próby), słaba adhezja – OD > 0,087 i ≤ 0,130, średnia adhezja – OD > 0,130 i ≤ 0,173, silna adhezja – OD > 0,173,
- dla szczepów inkubowanych w podłożu TSB: brak adhezji – OD ≤ 0,089 (wartość 0,089 uzyskano powiększając wartość średnią dla próby kontrolnej, jaką stanowiło podłoże TSB, o trzykrotne odchylenie standardowe tej próby), słaba adhezja – OD > 0,089 i ≤ 0,133, średnia adhezja – OD > 0,133 i ≤ 0,177, silna adhezja – OD > 0,177.

O c e n a w y t w a r z a n i a p o z a k o m ó r k o w e g o ś l u z u. Do oceny wytwarzania pozakomórkowego śluzu przez badane szczepy *E. coli* posłużono się metodą *Ishiguro i wsp.* (7) w modyfikacji własnej. Z 20-godzinnej hodowli badanych szczepów prowadzonej w temperaturze 37ºC w podłożu BHI i TSB uzyskiwano osad zgodnie z opisem umieszczonym powyżej i przygotowywano zawiesiny o gęstości 2 według skali MacFarlanda w PBS o pH 7,2. W jałowych probówkach typu Eppendorf umieszczano 500 µl uzyskanej zawiesiny i dodawano taką samą objętość roztworu czerwieni Congo (Congo Red, Sigma) o stężeniu 15 µg/ml. Mieszaninę wytrząsano przez 5 minut (1400 RPM), a następnie wirowano przy 13500 RPM przez 10 minut. Uzyskany supernatant umieszczano w studzienkach okrągłodennych, jałowych płytek 96-dołkowych i mierzono jego OD w wielodetekcyjnym czytniku mikropłytek Synergy HT, przy długości fali $\lambda = 480$ nm. Odczytu dokonywano względem próby zerowej, którą stanowiła mieszanina 500 µl PBS z taką samą objętością roztworu czerwieni Congo. Doświadczenie powtarzano trzykrotnie dla każdej z prób, a otrzymane wyniki uśredniano.

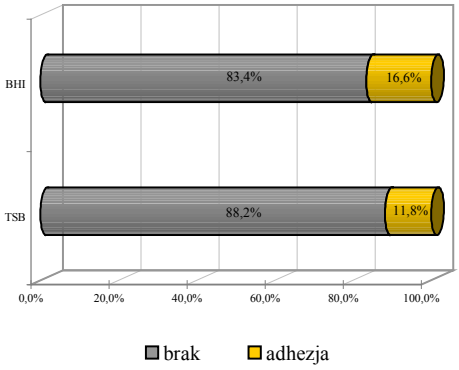
W celu obiektywizacji uzyskanych wyników równolegle prowadzono pomiar OD zawiesin bakteryjnych stosowanych w doświadczeniu. Otrzymane wyniki wiązania czerwieni Congo przeliczono na jedną jednostkę OD tych zawiesin.

Celem stwierdzenia istnienia różnic między dwiema zmiennymi wykorzystano testy: Manna-Whitneya (dla zmiennych ilościowych niezależnych), kolejności par Wilcoxona (dla zmiennych ilościowych zależnych) oraz test dwóch wskaźników struktury (dla zmiennych jakościowych) (8, 10). Wszystkie testy przeprowadzono przy ustalonym poziomie istotności $\alpha=0,05$.

WYNIKI

O c e n a a d h e z j i s z c z e p ó w *E. c o l i* d o p o l i s t y r e n u. Wyniki oceny adhezji 169 badanych szczepów *E. coli* hodowanych w podłożu BHI i TSB przedstawiono na rycinie 1.

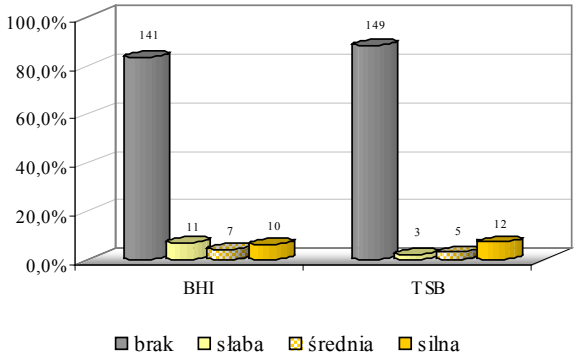
W warunkach hodowli BHI i TSB adhezję do polistyrenu wykazywało odpowiednio, 28 (16,6%) i 20 (11,8%) badanych szczepów. Mimo, iż odsetek szczepów adherujących do



Ryc. 1. Adhezja do polistyrenu szczepów *E. coli* (n=169) hodowanych w podłożu BHI i TSB

polistyrenu po hodowli w podłożu BHI był wyższy niż po hodowli w TSB, to nie stwierdzono różnic o znamienności statystycznej.

Szczegółowe wyniki adhezji badanych szczepów *E. coli* z uwzględnieniem stopnia adhezji ujmuje rycina 2. Po hodowli w podłożu BHI słabą adhezję stwierdzono u 11 (6,5%), średnią u 7 (4,2%), a silną u 10 (5,9%) szczepów. W warunkach hodowli TSB słabo adherowały 3, średnio 5 (2,9%), a silnie 12 (7,1%) szczepów.

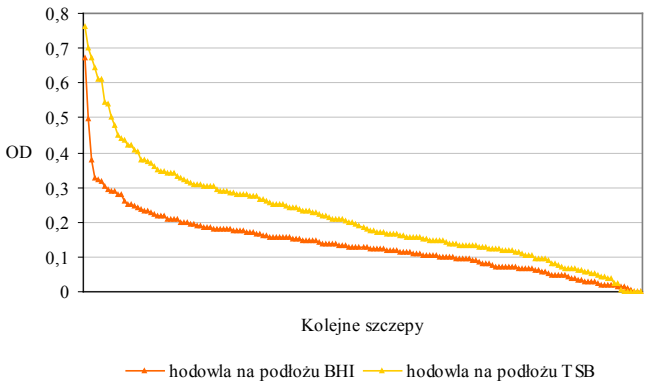


Ryc. 2. Adhezja do polistyrenu szczepów *E. coli* (n=169) hodowanych w podłożu BHI i TSB z uwzględnieniem stopnia adhezji

Spośród 7 laktozo-ujemnych szczepów żaden nie wykazywał zdolności adhezyjnych, zarówno po hodowli w podłożu BHI, jak i TSB.

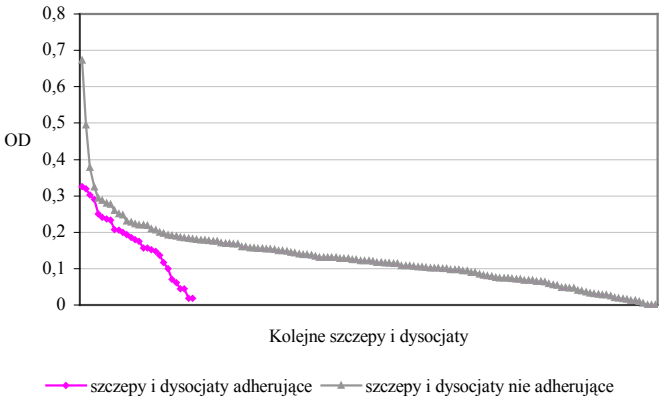
Na rycinach 3-5 przedstawiono wyniki oceny wytwarzania pozakomórkowego śluzu wyrażone jako wartość bezwzględna ubytku OD roztworu czerwieni Congo po inkubacji z zawiesiną bakteryjną.

Szczepy hodowane w podłożu TSB cechowały się istotnie wyższą absorpcją czerwieni Congo z roztworu w stosunku do szczepów hodowanych w podłożu BHI (p=0,000) (Ryc. 3).



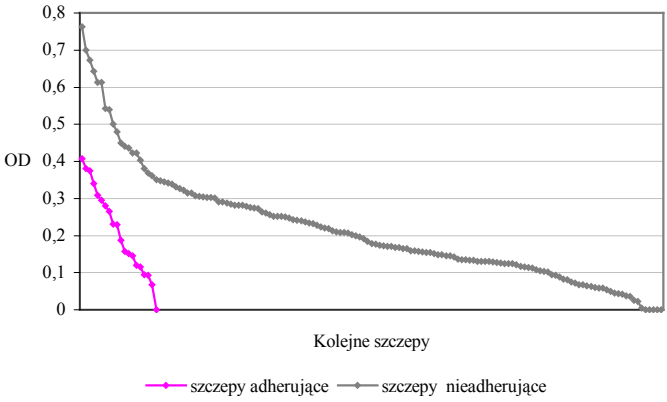
Ryc. 3. Zdolność wytwarzania pozakomórkowego śluzu szczepów *E. coli* (n=169) hodowanych w podłożu BHI i TSB

Szczepy nieadherujące do polistyrenu po hodowli w podłożu BHI wykazywały znamiennie statystycznie wyższą absorpcję czerwieni Congo z roztworu niż szczepy zdolne do adhezji do polistyrenu w tych samych warunkach hodowlanych (p=0,008) (Ryc. 4).



Ryc. 4. Zdolność wytwarzania pozakomórkowego śluzu przez adherujące (n=28) i nieadherujące (n=141) do polistyrenu szczepy *E. coli* hodowane w podłożu BHI

Nieadherujące do polistyrenu szczepy hodowane w podłożu TSB charakteryzowały się wyższą absorpcją czerwieni Congo z roztworu niż szczepy wykazujące adhezję do tego polimeru hodowane w tym samym podłożu. Jednak różnice te nie były istotne statystycznie (Ryc. 5).



Ryc. 5. Zdolność wytwarzania pozakomórkowego śluzu przez adherujące (n=20) i nieadherujące (n=149) do polistyrenu szczepy *E. coli* hodowane w podłożu TSB

DYSKUSJA

Stosując do oceny wytwarzania śluzu pozakomórkowego przez pałeczki *E. coli* metodę wiązania czerwieni Congo opracowaną przez *Ishiguro* i wsp. (7) w modyfikacji własnej, stwierdzono występowanie różnic pomiędzy szczepami adherującymi i nieadherującymi do polistyrenu. Wykazano, że szczepy, w przypadku których nie stwierdzono zdolności adhezji do polistyrenu, wykazywały wyższą absorpcję czerwieni Congo z roztworu, zarówno po hodowli w podłożu BHI, jak i TSB, co nasuwa wniosek o braku korelacji pomiędzy wytwarzaniem śluzu pozakomórkowego, a adhezją do polistyrenu. Podobne wyniki uzyskał *Deptuła* (4), który stwierdził brak związku pomiędzy wynikami uzyskanymi w ocenie wiązania czerwieni Congo, a adhezją do polistyrenu w grupie wielolekoopornych i wielolekowrażliwych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Zgodne z powyższymi wynikami są również wnioski sformułowane przez *Mathura* i wsp. (9). Autorzy oceniali wytwarzanie pozakomórkowego śluzu przez gronkowce metodą opartą na absorpcji czerwieni Congo z podłoża stałego i porównywali otrzymane wyniki z uzyskanymi w teście adhezji do polistyrenu. Stwierdzili brak związku pomiędzy wynikami otrzymanymi w tych dwóch testach.

Freeman i wsp. (5), którzy opracowali metodę wykrywania wytwarzania śluzu na podłożu z czerwienią Congo, stwierdzili ponad 86%. korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi w metodzie *Christensena* i wsp. (3) (metoda płytkowa, z użyciem safraniny, bądź błękitu trypanu jako znacznika barwnego) a własną.

Bartoszewicz i wsp. (2) badali zdolność wytwarzania śluzu przez koagulazo-ujemne gronkowce (CNS) dwiema powyższymi metodami i porównywali z wynikami adhezji badanych szczepów do cewników żylnych z politetrafluoroetylenu. Stwierdzili, że spośród 22 badanych szczepów CNS, 70,0% adherowało do cewników, ale nie wytwarzało śluzu. Inne wyniki uzyskały *Hoštacká i Šípošová* (6) stosując metodę wiązania czerwieni Congo wobec 82. szczepów *K. pneumoniae*. Autorki te obserwowały korelację pomiędzy wiązaniem barwnika z wynikami uzyskanymi w teście adhezji do para-ksylenu i teście agregacji w soli. Jednak nie oceniały one zdolności adhezji powyższych bakterii do innych polimerów. *Waldon i Szewczyk* (11) podjęły próbę oceny zdolności wytwarzania pozakomórkowego śluzu z użyciem metody kolorymetrycznej dla trzech grup szczepów: dwóch podgatunków *Staphylococcus cohnii*: *S. cohnii sp. cohnii* i *S. cohnii sp. urealyticus* oraz *Staphylococcus saprohyticus* izolowanych ze środowiska szpitalnego i pozaszpitalnego oraz z materiału pochodzącego od chorych i personelu szpitalnego. Autorki porównywały zdolność wytwarzania śluzu pozakomórkowego ze zdolnością adhezji badanych szczepów do komórek nabłonka policzkowego oraz nabłonka dróg moczowych i nie stwierdziły korelacji, tzn. zdolność wytwarzania śluzu pozakomórkowego nie sprzyjała adhezji badanych szczepów do komórek nabłonka. Szczepy gronkowców wytwarzające śluz słabo ulegały adhezji. W powyższej pracy próbowano również odpowiedzieć na pytanie, czy istnieje związek pomiędzy wytwarzaniem pozakomórkowego śluzu, a zdolnością adhezji szczepów *S. cohnii* do powierzchni tworzyw sztucznych powszechnie stosowanych w medycynie, w tym do cewników urologicznych. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zdolność wytwarzania śluzu wydaje się nie mieć wpływu na adhezję do stosowanych w badaniu powierzchni tworzyw sztucznych.

Baldassarri i wsp. (1) wysunęli hipotezę, że warstwa śluzu pozakomórkowego może utrudniać dostęp do elementów komórki gronkowców, które odpowiadają za wiązanie bakterii

z komórkami gospodarza. Zdolność adhezji do powierzchni komórek i tkanek często, choć nie zawsze, koreluje ze zdolnością adhezji do powierzchni tworzyw sztucznych, z jakich wykonane są biomateriały. Możliwe, że warstwa śluzu pozakomórkowego powstałego u badanych szczepów *E. coli* „zakrywa" struktury powierzchniowe komórki odpowiedzialne za wiązanie z powierzchnią polistyrenu.

P. Zalas-Więcek, E. Gospodarek, K. Piecyk

EXTRACELLULAR SLIME PRODUCTION AND ADHESION OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS TO POLYSTYRENE

SUMMARY

The aim of this study was evaluation of relationship between the ability of extracellular slime production and adhesive properties of *E. coli* strains. This study included 169 of *E. coli* strains isolated from urine and blood samples. All of these strains were isolated in the Clinical Microbiology Department of dr. A. Jurasz University Hospital in 2003-2006. After incubation in BHI and TSB medium adherence to polystyrene demonstrated 28 (16,6%) and 20 (11,8%) of *E. coli* strains, respectively. Strains incubated in TSB medium demonstrated higher production of extracellular slime than strains incubated in BHI medium. Non-adhering strains were producing more extracellular slime than adhering strains both after incubation in BHI as well as TSB medium.

PIŚMIENNICTWO

1. *Baldassarri L, Donnelli G, Gelosia A* i inni. Expression of slime interferes in vitro detection of host protein receptors of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun 1997; 65: 1522-6.
2. *Bartoszewicz M, Nowicka J, Rygiel A, Karoń J.* Fenotypowa charakterystyka gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z ran od pacjentów hospitalizowanych na oddziale oparzeniowym i chirurgii urazowej. Med Dośw Mikrobiol 2005; 57: 247-52.
3. *Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ* i inni. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates a quantitative model for adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985; 22: 996-1006.
4. *Deptuła A.* Wielolekowrażliwe i wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* – porównanie wybranych czynników wirulencji. Collegium Medicum im L. Rydygiera Bydgoszcz 2006; rozprawa doktorska
5. *Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT.* New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989; 42: 872-4.
6. *Hoštacká A, Šípošová E. Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: susceptibility to some antibiotics and surface hydrophobicity. Microbios 1998; 95: 101-7.
7. *Ishiguro E, Ainsworth T, Trust TJ, Kay WW.* Congo red agar, a differential medium for *Aeromonas salmonicida*, detects the presence of the cell surface protein array involved in virulence. J Bacteriol 1985; 164: 1233–7.
8. *Krysicki W, Bartos J, Dyczka W, Królikowska K, Wasilewska M.* Rachunek prawdopodobieństwa i statystyka matematyczna w zadaniach cz. II. Statystyka matematyczna. Warszawa: PWN 2002
9. *Mathur T, Singhal S, Khan S* i inni. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 25-9.

10. *Stanisz A.* Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Kraków: StatSoft Polska 2001
11. *Waldon E, Szewczyk EM.* Zdolność adhezji do komórek nabłonkowych i powierzchni tworzyw sztucznych szczepów *Staphylococcus cohnii* zasiedlających środowisko szpitalne. Med Dośw Mikrobiol 2002; 54: 109-18.

Otrzymano: 26 I 2009 r.

Adres Autora: 85-094 Bydgoszcz, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu