

## Wpływ zdolności do tworzenia biofilmu przez bakterie Gram-dodatnie na przebieg okresu pooperacyjnego u pacjentów leczonych kardiochirurgicznie

The impact of biofilm formation by Gram-positive bacteria on patient outcome following cardiac surgery



Agata Bilewska<sup>1</sup>, Urszula Łopaciuk<sup>2</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>3</sup>, Andrzej Młynarczyk<sup>3</sup>, Elżbieta Trafny<sup>4</sup>, Piotr Kołsut<sup>1</sup>, Szymon Kocańda<sup>1</sup>, Mariusz Kuśmierczyk<sup>1</sup>, Jacek M. Różański<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Kardiochirurgii i Transplantologii Instytutu Kardiologii w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii Instytutu Kardiologii w Warszawie

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>4</sup>Zakład Mikrobiologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2011; 8 (2): 255–261

### Streszczenie

**Wstęp:** Zdolność do tworzenia biofilmu charakteryzuje zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Biofilm jest skupiskiem komórek bakteryjnych zatopionym w polisacharydowej macierzy zewnątrzkomórkowej wytworzonej przez te bakterie. Zapewnia optymalne środowisko wzrostu i rozwoju, chroni przed działaniem antybiotyków oraz ułatwia wymianę materiału genetycznego. Odgrywa istotną rolę w powstawaniu i utrzymywaniu się infekcji po zabiegach chirurgicznych.

**Cel pracy:** Celem podjętych badań była próba ustalenia związku pomiędzy zdolnością do tworzenia biofilmu przez Gram-dodatnie ziarenkowce izolowane od pacjentów leczonych kardiochirurgicznie a niekorzystnym przebiegiem okresu pooperacyjnego.

**Materiał i metody:** Analizowano 44 szczepy *Staphylococcus epidermidis* oraz 27 szczepów *Enterococcus* spp. wyizolowane od 84 pacjentów leczonych kardiochirurgicznie na przestrzeni 13 miesięcy. U wyżej wymienionych gatunków ekspresję śluzu zewnątrzkomórkowego sprawdzano przy użyciu metody Freemana oraz Christensena. Stosując analizę regresji logistycznej, badano związek między zdolnością do tworzenia biofilmu a wystąpieniem niekorzystnego zdarzenia w okresie pooperacyjnym, takiego jak: zgon, zakażenie tkanki podskórnej, konieczność wykonania resternotomii, zakażenia układu oddechowego czy wystąpienia bakteremii.

**Wyniki:** Sześćdziesiąt jeden procent szczepów *Staphylococcus epidermidis* oraz 40,7% *Enterococcus* spp. wykazywało ekspresję śluzu zewnątrzkomórkowego. Średnia gęstość utworzonego przez *Staphylococcus epidermidis* biofilmu wyniosła  $1,013 \pm 0,739$ , a przez enterokoki  $0,233 \pm 0,075$ . Chorzy, od których wyizolowano *Staphylococcus epidermidis* produkujący biofilm, rozwijali za-

### Abstract

**Background:** The ability of biofilm formation occurs among both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biofilm is a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced polymeric matrix. It offers its members such benefits as an optimal microenvironment for growth, easy transmission of genes and resistance to antibiotics. Biofilm formation plays an essential role in pathogenesis of surgical site infections.

**Aim:** The aim of the study was to assess whether there is a relationship between biofilm formation by Gram-positive cocci and complications following cardiac surgery.

**Material and methods:** 44 *Staphylococcus epidermidis* and 27 *Enterococcus* spp. strains isolated from 84 patients treated in the cardiac surgery unit were investigated. Colony morphology was studied on Congo Red Agar, according to Freeman's method. Quantitative estimation of biofilm formation was performed by the method of Christensen. To determine the relationship between biofilm formation and complications following cardiac surgery such as mortality, bacteraemia, respiratory tract infections, subcutaneous infections and resternotomy, multiple logistic regression models were used.

**Results:** 61% of *S. epidermidis* and 40.7% of *Enterococcus* spp. were slime-producing strains. The average optical densities of bacterial films for *S. epidermidis* and *Enterococcus* spp. were  $1.013 \pm 0.739$  and  $0.233 \pm 0.075$  respectively. Patients infected by slime-producing *S. epidermidis* strains were nearly 7 times more likely to develop subcutaneous infection (OR = 6.9,  $p = 0.105$ ). Isolation of *S. epidermidis* or *Enterococcus* spp. positive in CRA test correlated with the frequency of subcutaneous infection following cardiac surgery (OR = 2.364,  $p = 0.209$ ).

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Agata Bilewska, Klinika Kardiochirurgii i Transplantologii, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04-628 Warszawa, tel. +48 22 343 46 10, faks +48 22 343 45 39, e-mail: agatabilewska@o2.pl

każenie tkanki podskórnej prawie 7 razy częściej niż pacjenci, od których uzyskano *Staphylococcus epidermidis* niewykazujący ekspresji śluzu zewnątrzkomórkowego ( $p = 0,105$ ). Pacjenci, od których wyizolowano *Staphylococcus epidermidis* lub *Enterococcus* spp. produkujące biofilm, mieli iloraz szans (ang. *odds ratio* – OR) wystąpienia zakażenia tkanki podskórnej równy 2,364 ( $p = 0,209$ ).

**Wnioski:** Większość badanych szczepów charakteryzowała się zdolnością do produkcji biofilmu, co mogło stanowić o ich zwiększonej patogenności i ułatwiać zakażenie materiałów stosowanych w kardiologii. Wyizolowanie *Staphylococcus epidermidis* lub *Enterococcus* spp. od pacjenta może zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia tkanki podskórnej po zabiegu kardiologicznym.

**Słowa kluczowe:** biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp.

## Wstęp

Zdolność do tworzenia biofilmu jest powszechnie występującą cechą patogenności bakterii. Biofilm jest wspólnotą komórek bakteryjnych, charakteryzującą się określoną strukturą zewnętrzną zatopioną w macierzy zewnątrzkomórkowej, wytworzonej przez elementy należące do tej wspólnoty i przytwierdzonej do powierzchni żywych lub nieżywych [1]. Zapewnia budującym go bakteriom optymalne środowisko wzrostu i rozwoju, dostępność składników pokarmowych, łatwą wymianę materiału genetycznego oraz chroni przed układem immunologicznym gospodarza – utrudnia fagocytozę i opsonizację [2]. Komórki bakterii budujących biofilm są ponadto bardziej odporne na działanie antybiotyków niż formy planktoniczne tego samego gatunku [3–7]. Biofilm jest w stanie równowagi dynamicznej. Pod wpływem czynników zewnętrznych fragmenty błony biologicznej, składające się z dużych agregatów bakteryjnych, odrywają się i mogą przemieszczać się na znaczne odległości [8–10]. Jeśli odbywa się to w ciele człowieka, dochodzi do indukcji zakażeń o różnej lokalizacji.

U pacjentów leczonych kardiologicznie występuje potencjalnie większe ryzyko rozwinięcia infekcji szpitalnej niż u innych chorych. Wynika to z posiadania dużej liczby ran chirurgicznych (po sternotomii, po pobraniu żyły odpiszczelowej, tętnicy promieniowej), inwazyjnego monitorowania hemodynamicznego oraz częstego stosowania kontrapulsacji wewnątrzaoortalnej. Zakażeniu może sprzyjać również nieodpowiednia antybiotykoterapia w okresie okołoperacyjnym [11]. Przyczynia się ona do selekcji wysokoopornych patogenów, które wywołują infekcje o znacznie cięższym przebiegu i wyższej śmiertelności.

Zastosowanie sztucznych materiałów, takich jak: zastawkowe protezy mechaniczne, grafty naczyniowe, urządzenia wspomagające prace niewydolnego serca, szwów metalowych rutynowo stosowanych w kardiologii również zwiększa ryzyko rozwoju zakażenia wywołanego przez patogeny produkujące biofilm.

**Conclusions:** The majority of investigated strains were slime producing. Biofilm formation was related to increased pathogenicity. Isolation of strains able to form biofilm may be related to the development of subcutaneous infection following cardiac surgery.

**Key words:** biofilm formation, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp.

## Cel pracy

Głównym celem podjętych badań było przeanalizowanie, czy istnieje związek pomiędzy produkcją biofilmu przez wybrane szczepy ziarenkowców Gram-dodatnich wyizolowanych od pacjentów leczonych kardiologicznie a niekorzystnym przebiegiem okresu pooperacyjnego rozumianym jako wystąpienie zgonu, zakażenia tkanki podskórnej, zakażenia układu oddechowego, bakteriemii czy konieczności wykonania resternotomii.

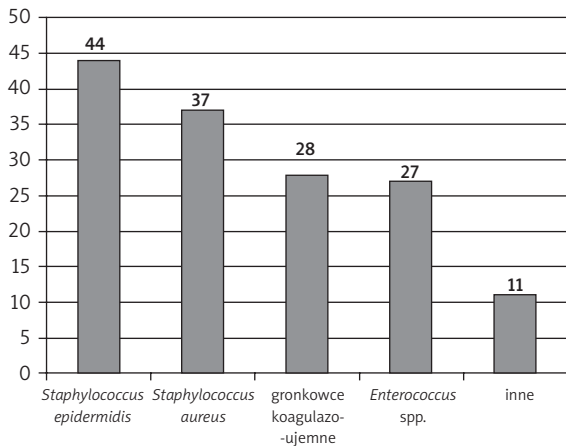
## Materiał i metody

### Pacjenci

Grupę objętą analizą stanowiło 84 pacjentów leczonych kardiologicznie w okresie od sierpnia 2008 do września 2009 r. W skład badanej populacji wchodziło 59 mężczyzn i 25 kobiet w wieku 15–83 lat (średnia wieku  $60,79 \pm 11,70$  roku). Warunkiem kwalifikacji do grupy badanej było stwierdzenie zakażenia szczepem Gram-dodatnim. Od każdego pacjenta w toku hospitalizacji wyizolowano 1–7 szczepów bakteryjnych różnych gatunków. Chorzy zostali poddani 24 operacjom wieńcowym, 36 operacjom zastawkowym (w tym operacjom wymiany kilku zastawek serca), 6 operacjom wieńcowym z jednoczesną wymianą zastawki oraz 15 innym zabiegom, w tym 7 transplantacjom serca.

### Izolaty bakteryjne

Od pacjentów uzyskano 147 szczepów bakterii Gram-dodatnich. Najliczniejszą grupę stanowiły izolaty *Staphylococcus epidermidis* (29,93%), w dalszej kolejności były to izolaty *Staphylococcus aureus* (25,17%), gronkowce koagulazo-ujemne (ang. *coagulase-negative staphylococci* – CNS), których nie charakteryzowano do gatunku (19,05%), *Enterococcus* spp. (18,37%) oraz inne (7,48%). Szczegółowej analizie mikrobiologicznej poddano szczepy *Staphylococcus epidermidis* oraz *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus gallinarum*.



Ryc. 1. Ilościowy rozkład szczepów wyizolowanych od pacjentów

Materiały do badań mikrobiologicznych uzyskiwano od badanej grupy zarówno w bezpośrednim, jak i odległym okresie pooperacyjnym. Bakterie najczęściej izolowano z krwi oraz z ran klatki piersiowej.

### Identyfikacja bakterii Gram-dodatnich

Identyfikacja gronkowców była prowadzona przy użyciu testów ID 32 Staph (bioMérieux, Francja) oraz testu lateksowego Slidex Staph Plus (bioMérieux, Francja). Enterokoki identyfikowano na podstawie testów Api 20 Strept, rozkładu eskuliny, wzrostu w 6,5-procentowym chlorku sodu oraz wykrywania L-pyrolidonylo-aryloamidazy.

### Przechowywanie izolatów bakteryjnych

Wszystkie uzyskane szczepy bakterii Gram-dodatnich, po ich wcześniejszej identyfikacji, przechowywano do dalszych analiz w głębokim zamrożeniu w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  w podłożu z wyciągu mózgowo-sercowego (ang. *brain heart infusion* – BHI). Do dalszych badań wyżej wymienione szczepy ożywiają poprzez dwukrotny pasaż na podłożu *Columbia Agar* i inkubację w warunkach tlenowych w temperaturze  $35^{\circ}\text{C}$  przez 24 godz.

### Zmodyfikowana metoda Freemana oceniająca ekspresję śluzu zewnątrzkomórkowego

Wszystkie szczepy *Staphylococcus epidermidis* oraz *Enterococcus* spp. przebadano metodą Freemana [12]. Szczep wzorcowy *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3598, o udowodnionej zdolności do produkcji biofilmu, stanowił kontrolę dodatnią. Czystą hodowlę poszczególnych badanych szczepów, uzyskaną po wcześniejszej inkubacji na podłożu *Columbia Agar*, posiewano na podłoże z dodatkiem czerwieni kongo (ang. *congo red agar* – CRA). Skład tego podłoża przygotowano zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Freemana, na bazie TSA (bioMérieux, Francja), z dodatkiem sacharozy w ilości 36 g/l oraz czerwieni kongo w ilości 0,8 g/l. Następnie inkubowano je w temperaturze  $35^{\circ}\text{C}$



wynik ujemny  
(kolor czerwony)



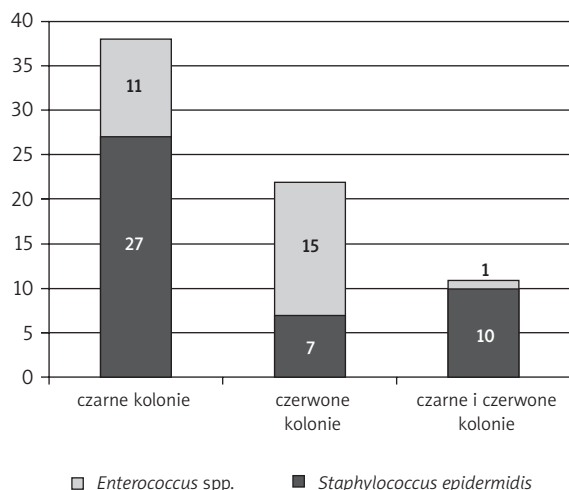
wynik dodatni  
(kolor czarny)

Ryc. 2. Metoda Freemana – jakościowa ocena zdolności do tworzenia biofilmu

w warunkach tlenowych przez 24 godz. Po pierwszej dobie inkubację przedłużano o kolejne 24 godz. w temperaturze pokojowej. Po 2 dobach oceniano morfologię kolonii. Dodatni wynik doświadczenia (+) uzyskano, gdy badane szczepy rosły w postaci czarnych kolonii (tak jak szczep wzorcowy). Pojawienie się czarnych kolonii oznaczało ekspresję biofilmu na poziomie fenotypu. Za wynik negatywny (–) uznawano wzrost w postaci czerwonych kolonii – takie szczepy nie produkowały śluzu zewnątrzkomórkowego. Wzrost w postaci czarnych i czerwonych kolonii jednocześnie charakteryzował heterogenną populację, oznaczoną jako  $\pm$ .

### Zmodyfikowana metoda według Christensena

Zdolność do tworzenia biofilmu przez *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus* spp. oceniano w metodzie półilościowej z fioletem krystalicznym [13]. Po uzyskaniu czystej hodowli badanego szczepu na podłożu z krwawym agarem przesiewano ją do 5 ml podłoża płynnego – TSB (bioMérieux, Francja) z 0,25-procentową glukozą i inkubowano ją w warunkach tlenowych, w temperaturze  $35^{\circ}\text{C}$  przez 18 godz. Następnie płynną hodowlę rozcieńczano w TSB z 0,25-procentową glukozą w stosunku 1 : 40. Na sterylne mikropłytki nanoszono po 200  $\mu\text{l}$  rozcieńczonej hodowli szczepu i inkubowano przez 9 godz. w warunkach tlenowych, w temperaturze  $35^{\circ}\text{C}$ . Po inkubacji studzienki płukano trzykrotnie sterylnym PSB w temperaturze pokojowej (po 200  $\mu\text{l}$  na pojedyncze płukanie do każdej studzienki). Utworzony na dnie biofilm wybarwiono fioletem krystalicznym przez 15 min, po czym trzykrotnie płukano wodą destylowaną. Po osuszeniu studzienek i wypełnieniu ich 200  $\mu\text{l}$  96-procentowego sterylnego etanolu odczytywano gęstość optyczną za pomocą Microplate Manager 4.0, Bio-Rad Laboratories Inc. model 550 przy długości fali 550 nm. Kontrolą dodatnią w opisanym metodzie był szczep wzorcowy *Staphylococcus epidermidis* ATCC 3598. Kontrolę ujemną stanowiła pusta studzienka.



Ryc. 3. Wyniki analizy szczepów z zastosowaniem metody Freemana

### Analiza wpływu zdolności do tworzenia biofilmu przez szczepy *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus spp.* na niekorzystny przebieg okresu pooperacyjnego

W celu zbadania ewentualnego wpływu zdolności do tworzenia biofilmu przez wybrane bakterie na niekorzystny przebieg okresu pooperacyjnego, rozumiany jako wystąpienie zgonu, zakażenie tkanki podskórnej, zakażenie układu

Tab. I. Wyniki metody ilościowej oceniającej zdolność do produkcji biofilmu *Staphylococcus epidermidis*

Liczba porządkowa	Numer szczepu	Gęstość biofilmu	Liczba porządkowa	Numer szczepu	Gęstość biofilmu
1.	1	0,578	20.	77	0,732
2.	3	0,620	21.	78 (I)	3,500
3.	4	2,122	22.	94	0,648
4.	5	0,879	23.	106	0,574
5.	6	0,640	24.	112	0,750
6.	7	1,354	25.	114	0,384
7.	8	0,749	26.	118	2,103
8.	13	2,356	27.	129	0,594
9.	22	0,602	28.	130	0,414
10.	35	0,639	29.	131	0,306
11.	44	1,086	30.	139	0,272
12.	45	1,124	31.	140	0,904
13.	50	1,290	32.	143	0,687
14.	53	1,065	33.	144	0,647
15.	63	0,910	34.	147	0,400
16.	69	3,184	35.	148	0,570
17.	70	1,424	36.	149	0,424
18.	72	1,046	37.	152	0,911
19.	74	0,690	38.	kontrola (+)	1,328

oddechowego, bakteriemii lub konieczność wykonania resternotomii, utworzono następujące grupy pacjentów: I grupę stanowili pacjenci, od których wyizolowano *Staphylococcus epidermidis* wykazujący ekspresję śluzu zewnątrzkomórkowego (opisanego konkretną wartością liczbową); II grupa objęła chorych, od których izolowano *Enterococcus spp.* produkujący biofilm (opisany konkretną wartością liczbową); III grupa to pacjenci, od których hodowano *Staphylococcus epidermidis*, a IV – *Enterococcus spp.* niewykazujący ekspresji śluzu; w grupie V umieszczono chorych, od których wyizolowano *Staphylococcus epidermidis*, a w VI – *Enterococcus spp.* wykazujący fenotypowo cechę zdolności do tworzenia biofilmu; grupa VII powstała w wyniku połączenia grup V i VI. Skontrastowano ze sobą następujące grupy: I i III, II i IV, V i III, VI i IV, VII i III + IV.

### Analiza statystyczna

Wpływ zdolności do tworzenia biofilmu na parametry niekorzystnego przebiegu okresu pooperacyjnego badano za pomocą analizy regresji logistycznej. Wyniki prezentowane są jako iloraz szans (ang. *odds ratio* – OR) wystąpienia niekorzystnego zdarzenia wraz z jego 95-procentowym przedziałem ufności (ang. *95% confidence interval* – 95% CI) i poziomem istotności ( $p < 0,05$ ).

Obliczenia przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego R 2.9.1 (R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>).

### Wyniki

W populacji *Staphylococcus epidermidis* 61% szczepów wykazywało zdolność do produkcji śluzu zewnątrzkomórkowego, rosnąc w postaci czarnych kolonii na podłożu z czerwieni kongo; 22,7% szczepów wykazywało heterogeny wzrost w postaci jednocześnie czarnych i czerwonych kolonii; 15,9% badanych szczepów nie wykazywało fenotypowo zdolności do tworzenia śluzu, rosnąc jako czerwone kolonie. Wśród *Enterococcus spp.* mniej niż 41% charakteryzowało się zdolnością do produkcji śluzu, 55% dało wynik (-) (czerwone kolonie), a 3,7% wykazywało heterogeny wzrost (jednoczasowy wzrost na czarno i czerwono).

Wszystkie szczepy, które w powyższej metodzie dały wynik (+) lub wykazywały heterogeny typ wzrostu, przebadano metodą ilościową. Zestawienie gęstości utworzonego biofilmu przez *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus spp.* przedstawiają tabele I i II.

Wszystkie wartości utworzonego biofilmu w nich podane mają charakter względny, powstały w wyniku odjęcia od wartości bezwzględnej wielkości charakteryzującej kontrolę ujemną i wynoszącą dla *Staphylococcus epidermidis* średnio 0,23, a dla *Enterococcus spp.* 0,056. Kontrolę dodatnią stanowił szczep wzorcowy *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, o udowodnionej zdolności do produkcji biofilmu. Wartość utworzonego biofilmu dla wspomnianego szczepu wzorcowego wyniosła 1,328. Maksymalna gęstość optyczna roztworu powstałego po wybarwieniu fioletem

krystalicznym utworzonego biofilmu przez szczepy *Staphylococcus epidermidis* i odczytywana przy długości fali 550 nm wyniosła 3,5. Wartość minimalna sięgnęła 0,272 (średnio 1,013 ±0,74). Dla enterokoków największą gęstość optyczną roztworu uzyskano na poziomie 0,386, a najmniejszą na poziomie 0,133 (średnio 0,233 ±0,075).

Wyniki analizy wpływu zdolności do tworzenia biofilmu na wystąpienie zgonu, zakażenia tkanki podskórnej, zakażenia układu oddechowego, bakteriemii lub konieczności wykonania resternotomii przedstawia tabela III.

Dla chorych, od których wyizolowano *Staphylococcus epidermidis* produkujący biofilm, OR wystąpienia zakażenia tkanki podskórnej był równy 6,8 ( $p = 0,105$ ).

Pacjenci, którzy byli zakażeni *Staphylococcus epidermidis* lub *Enterococcus* spp. produkującymi biofilm, mieli OR wystąpienia zakażenia tkanki podskórnej równy 2,364 ( $p = 0,209$ ).

**Tab. II.** Wyniki metody ilościowej oceniającej zdolność do produkcji biofilmu u *Enterococcus* spp.

Liczba porządkowa	Numer szczepu	Gęstość biofilmu
1.	15	0,201
2.	20	0,237
3.	96	0,386
4.	107	0,288
5.	109	0,288
6.	110	0,157
7.	113	0,180
8.	117	0,190
9.	119	0,133
10.	123	0,165
11.	124	0,275
12.	136	0,299
13.	kontrola (+)	1,328

**Tab. III.** Analiza wpływu zdolności do tworzenia biofilmu na niekorzystny przebieg okresu pooperacyjnego

ZGON				
Bakterie	OR	95% CI		<i>p</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> tworzy biofilm	0,844	0,337	2,117	0,718
<i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	0,053	0,000	56,472	0,409
<i>Staphylococcus epidermidis</i> wartość biofilmu	1,077	0,156	7,421	0,940
<i>Enterococcus</i> spp. wartość biofilmu	0,500	0,065	3,845	0,505
<i>Staphylococcus epidermidis</i> lub <i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	0,672	0,187	2,419	0,543
ZAKAŻENIE TKANKI PODSKÓRNEJ				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> tworzy biofilm	1,931	0,712	5,234	0,196
<i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	0,936	0,001	884,435	0,985
<i>Staphylococcus epidermidis</i> wartość biofilmu	<b>6,875</b>	0,667	70,820	0,105
<i>Enterococcus</i> spp. wartość biofilmu	1,000	0,132	7,571	1,000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> lub <i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	<b>2,364</b>	0,619	9,032	0,209
RESTERNOTOMIA				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> tworzy biofilm	0,925	0,387	2,212	0,861
<i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	<b>4,345</b>	0,000	110806,5	0,777
<i>Staphylococcus epidermidis</i> wartość biofilmu	0,583	0,092	3,717	0,568
<i>Enterococcus</i> spp. wartość biofilmu	1,800	0,091	35,422	0,699
<i>Staphylococcus epidermidis</i> lub <i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	1,375	0,331	5,716	0,661
ZAKAŻENIE UKŁADU ODDECHOWEGO				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> tworzy biofilm	0,581	0,159	2,115	0,410
<i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	0,004	0,000	68,898	0,272
<i>Staphylococcus epidermidis</i> wartość biofilmu	1,786	0,166	19,247	0,633
<i>Enterococcus</i> spp. wartość biofilmu	0,400	0,031	5,151	0,482
<i>Staphylococcus epidermidis</i> lub <i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	1,222	0,253	5,910	0,803
BAKTERIEMIA				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> tworzy biofilm	0,276	0,063	1,199	0,086
<i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	7,996	0,008	8434,559	0,558
<i>Staphylococcus epidermidis</i> wartość biofilmu	0,818	0,132	5,084	0,830
<i>Enterococcus</i> spp. wartość biofilmu	1,000	0,132	7,571	1,000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> lub <i>Enterococcus</i> spp. tworzy biofilm	0,898	0,248	3,248	0,870

95% CI – 95-procentowy przedział ufności (ang. confidence interval); OR – iloraz szans (ang. odds ratio); *p* – poziom istotności.

## Dyskusja

Zdolność do tworzenia biofilmu jest powszechnie znaną cechą patogenności bakterii. Ma ona istotne znaczenie – zwłaszcza w przypadku słabych patogenów, takich jak gronkowiec skórny, u którego jest to jedyny czynnik patogenności. Rosnąc na standardowych podłożach, wykorzystywanych w procesie identyfikacji, gronkowce nie mają śluzowej morfologii. Żeby scharakteryzować je pod kątem możliwości formowania biofilmu, konieczne jest zastosowanie zmodyfikowanej metody Freemana. Bakterie, rosnąc na podłożu wzbogaconym, produkują śluz, który tworzy barwne (czarne) kompleksy z polisacharydowymi komponentami śluzu [12]. Zaletą wspomnianej metody jest nie tylko jej prostota, ale również ogromna powtarzalność. W wyniku przeprowadzenia powyższego testu (CRA) ustalono, że w badanej populacji szczepów *Staphylococcus epidermidis* 61,36% charakteryzowało się zdolnością do tworzenia śluzu zewnątrzkomórkowego, a 22,75% rosnąc na podłożu CRA, ujawniło heterogeny typ kolonii. W grupie enterokoków odsetek szczepów rosnących w postaci czarnych kolonii wyniósł 40,74%; 55,56% badanych szczepów nie wytwarzało śluzu. Dane z piśmiennictwa odnoszące się do szczepów pochodzących od chorych leczonych kardiochirurgicznie i produkujących biofilm są nieliczne. Jedyna dostępna na ten temat publikacja pochodzi ze Szwecji z 2007 r. i podaje, że 52% izolatów *Staphylococcus epidermidis* uzyskanych od chorych reoperowanych wykazywało dodatnią reakcję w teście z czerwienią kongo [14]. Inne doniesienia pokazują, że średnio 36,8–57,5% szczepów gronkowca skórniego wykazuje śluzową morfologię na podłożu CRA [15–19]. Należy jednak odnotować, że powyższe wyniki dotyczą bakterii wyizolowanych od pacjentów poddawanych reoperacjom ortopedycznym lub pochodzą od chorych, u których stwierdzono zakażenie krwi związane z długim utrzymywaniem cewników naczyniowych. W opinii autorów powyższa metoda powinna zostać włączona do algorytmu diagnostyki zakażeń wywołanych przez słabe patogeny, takie jak CNS, w tym *Staphylococcus epidermidis*. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, w których na wyniku posiewu z rany pooperacyjnej widnieje sugestja, że otrzymany gronkowiec skórny jest wynikiem zanieczyszczenia powstałego podczas pobierania materiału. Rozszerzenie diagnostyki o test z czerwienią kongo pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy dany *Staphylococcus epidermidis* tworzy biofilm, co jest równoznaczne z jego silną patogennością. Spowoduje to również wdrożenie leczenia antybiotykami w celu uniknięcia poważnych powikłań infekcyjnych stanowiących zagrożenie życia dla pacjentów po operacjach kardiochirurgicznych.

Głównym celem pracy była próba ustalenia związku pomiędzy zdolnością do tworzenia biofilmu przez szczepy bakterii wyhodowane od chorych zakażonych, tj. szczepy *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, a niekorzystnym przebiegiem okresu pooperacyjnego rozumianego jako wystąpienie jednego z pięciu punktów końcowych (zgonu, resternotomii, zakażenia tkanki podskórnej, zakażenia układu oddechowego i bakteriemii).

W grupie pacjentów, od których wyizolowano *Staphylococcus epidermidis* tworzący biofilm, zauważono skłonność

do częstszego występowania zakażenia tkanki podskórnej (OR = 6,8) w stosunku do chorych, których *Staphylococcus epidermidis* nie wykazywał ekspresji śluzu zewnątrzkomórkowego. Stosunkowo niski poziom istotności ( $p = 0,1$ ) może świadczyć o sile tej tendencji, bowiem prawdopodobieństwo, że wynik ten jest przypadkiem, wynosi tylko 10%. Podobna skłonność cechowała grupę, w której mieścili się pacjenci zarówno z gronkowcem skórnym, jak i enterokokami o fenotypie biofilm (+). Ponad dwukrotnie częściej (OR = 2,36) stwierdzano u nich zakażenie tkanki podskórnej w porównaniu z populacją chorych, których bakterie nie wykazywały zdolności do tworzenia biofilmu. Brak istotności statystycznej w wyżej opisanych przypadkach najprawdopodobniej wynika z faktu, że poszczególne porównywane ze sobą grupy były stosunkowo nieliczne. Jak do tej pory, nie ma żadnych danych w piśmiennictwie dotyczących wpływu występowania biofilmu na wystąpienie powikłań pooperacyjnych w kardiochirurgii, w związku z czym trudno dyskutować nad otrzymanymi wynikami. Aby udowodnić ponad wszelką wątpliwość prawdziwość zaobserwowanych tendencji, zaplanowano rozszerzenie badania o kolejne szczepy *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus* spp. Wypływające z takiego badania wnioski mogłyby mieć kluczowe znaczenie dla praktyki nie tylko kardiochirurgicznej.

## Wnioski

Większość szczepów *Staphylococcus epidermidis* i mniej niż połowę enterokoków charakteryzowała zdolność do produkcji biofilmu, co mogło stanowić o ich zwiększonej patogenności i umożliwiać zakażenie materiałów stosowanych w kardiochirurgii – zarówno pochodzenia sztucznego, jak i naturalnego.

Diagnostyka zakażeń spowodowanych przez CNS powinna zostać rozszerzona o test wykrywający zdolność do produkcji śluzu zewnątrzkomórkowego.

Stwierdzenie zakażenia *Staphylococcus epidermidis* lub *Enterococcus* spp. wykazującym ekspresję śluzu zewnątrzkomórkowego może zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia tkanki podskórnej po zabiegu kardiochirurgicznym.

## Piśmiennictwo

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
2. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 163-173.
3. Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* 1990; 161: 37-40.
4. Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis* 1994; 170: 720-723.
5. Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Can J Microbiol* 1992; 38: 618-625.
6. Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1347-1351.
7. Gilbert P, Brown M. Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents. P 118-130 In: Lappin-Scott HM, Costerton J (eds). *Microbial biofilms*. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge University Press, New York.

8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
9. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 155-166.
10. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176: 2137-2142.
11. Dunagan WC, Woodward RS, Medoff G, Gray JL, Casabar E, Lawrenz C, Spitznagel E, Smith MD. Antibiotic misuse in two clinical situations: positive blood culture and administration of aminoglycosides. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 405-412.
12. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42: 872-874.
13. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 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: 996-1006.
14. Soderquist B. Surgical site infections in cardiac surgery: microbiology. *APMIS* 2007; 115: 1008-1011.
15. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials* 2002; 23: 4233-4239.
16. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2: 478-484.
17. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Baldassarri L, Montanaro L. Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. *Acta Orthop Scand* 2003; 74: 617-621.
18. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2151-2156.
19. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, Speziale P, Montanaro L. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* 2005; 26: 6530-6535.