

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. Jadwiga Roszkiewicz

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Identyfikacja szczepów
Staphylococcus aureus izolowanych
od pacjentów z rozpoznaniem
czyraczności przewlekłej przy pomocy
nowoczesnych technik diagnostycznych
celem wdrożenia ukierunkowanej
terapii i prewencji.

Wioletta Barańska-Rybak

Promotor: dr hab. Roman Nowicki, prof. nzw. AMG

Gdańsk 2006

Serdeczne podziękowania:

Promotorowi: **Panu Prof. nzw. AMG dr hab. Romanowi Nowickiemu** – za opiekę, mobilizację, cenne rady i ogromną życzliwość w trakcie przygotowywania pracy

Panu Prof. Arturowi Schmidtchenowi – za udostępnienie wspaniałego warsztatu pracy oraz pomoc merytoryczną i praktyczną podczas wykonywania badań w Centrum Biomedycznym Uniwersytetu w Lund w Szwecji

Kierownikowi Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AMG: **Pani Prof. dr hab. Jadwidze Roszkiewicz** – za umożliwienie przeprowadzenia badań i zapewnienie atmosfery sprzyjającej realizacji doktoratu

Kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Klinicznej SPSK1: **Panu dr med. Alfredowi Sametowi** – za możliwość wykonania badań bakteriologicznych i cenną praktyczną pomoc

Kierownikowi Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej: **Panu Prof. dr hab. Józefowi Kurowi i Pani dr med. Beacie Krawczyk** – za pomoc w wykonaniu badań molekularnych technikami PCR

Mężowi – za wyrozumiałość i wsparcie

oraz wszystkim którzy przyczynili się do powstania tej pracy

Spis treści

Spis treści	I
Wykaz skrótów	IV
1. Wstęp	1
1.1. Charakterystyka ogólna <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1.1. Morfologia.....	2
1.1.2. Budowa antygenowa	2
1.1.3. Właściwości fizjologiczne.....	2
1.1.4. Czynniki chorobotwórczości gronkowca złocistego.....	3
1.2. Identyfikacja <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2.1. Preparaty barwione metodą Grama	4
1.2.2. Posiewy	4
1.2.3. Próba na obecność koagulazy	5
1.2.4. Próba na obecność czynnika zlepiającego	5
1.2.5. Mikrotest Api Staph	5
1.2.6. Staphyslide – Test	6
1.3. Metody fenotypowe identyfikacji gronkowca złocistego	6
1.3.1. Profile oporności na antybiotyki	6
1.3.2. Typowanie bakteriofagowe	7
1.3.3. Zymotypy	8
1.4. Metody genotypowe stosowane w typowaniu <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.4.1. Analiza profili plazmidowych.....	9
1.4.2. Analiza restrykcyjna DNA chromosomalnego w połączeniu z elektroforezą plusową (RFLP/PFGE)	9
1.4.3. Metody genotypowania oparte o reakcję PCR.....	10
1.4.3.1. Amplifikacja znanych regionów genomu połączona z analizą restrykcyjną.....	10
1.4.3.2. Amplifikacja losowych fragmentów DNA (AP PCR, RAPD, DAF).....	11
1.4.3.3. Multipleks PCR.....	12
1.4.3.4. Rybotypowanie	12
1.4.3.5. Techniki fingerprinting	13
1.4.3.5.1. Rep - PCR.....	14
1.4.3.5.2. AFLP	14
1.4.3.5.3. ADSRRS - fingerprinting	15
1.5. Rola <i>Staphylococcus aureus</i> w chorobach skóry.....	18
1.6. Mechanizmy oporności <i>Staphylococcus aureus</i> na środki przeciwbakteryjne.....	20
1.6.1. Mechanizmy genetyczne warunkujące oporność gronkowców na środki przeciwdrobnoustrojowe.	20
1.6.2. Oporność <i>Staphylococcus aureus</i> na antybiotyki.....	22

1.6.2.1. Inaktywacja enzymatyczna	22
1.6.2.2. Zmiana powinowactwa do leku lub dublowanie funkcji miejsca docelowego	23
1.6.2.3. Aktywne usuwanie związku z komórki	24
1.7. <i>Staphylococcus aureus</i> a naturalne peptydy antybakteryjne	25
1.7.1. Czym są naturalne peptydy antybakteryjne?	25
1.7.2. Właściwości wybranych peptydów antybakteryjnych	26
2. Cele pracy	30
3. Materiały i metody	31
3.1. Izolaty <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.2. Określenie lekooporności badanych szczepów <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.3. Typowanie bakteriofagowe szczepów <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.4. Metody biologii molekularnej zastosowane w analizie szczepów <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.4.1. Izolacja genomowego DNA i technika ADSRRS-fingerprinting	35
3.4.1.1. Elektroforeza agarozowa	36
3.4.1.2. Trawienie restrykcyjne genomowego DNA	38
3.4.1.3. Precypitacja po trawieniu	40
3.4.1.4. Reakcja ligacji	41
3.4.1.5. Precypitacja po ligacji	43
3.4.1.6. Reakcja PCR	44
3.4.1.7. Elektroforeza poliakrylamidowa	45
3.4.1.8. ODCZYNNIKI - składniki buforów i roztworów	46
3.4.2. Technika RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)	47
3.4.3. Elektroforeza pulsacyjna fragmentów restrykcyjnych – PFGE	49
3.5. Oznaczanie wrażliwości szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> w stosunku do naturalnych peptydów antybakteryjnych	50
3.5.1. Peptydy	50
3.5.2. Technika radiodyfuzji	50
3.5.3. Metoda jednostek tworzących kolonie (CFU- Colony Forming Units)	51
3.5.4. Metoda jednostek tworzących kolonie dla oceny aktywności przeciwbakteryjnej HBD3	51
3.5.5. Technika frakcjonowanych stężeń hamujących	52
4. Wyniki	53
4.1. Analiza lekooporności badanych izolatów <i>Staphylococcus aureus</i>	53
4.2. Rezultaty typowania fagowego	57
4.3. Badanie nosicielstwa <i>Staphylococcus aureus</i> wśród pacjentów z czyracznością nawrotową	59
4.4. Rodzinne występowanie czyraczności wśród pacjentów z czyracznością nawrotową	60

4.5. Badanie zależności między czasem trwania choroby a opornością na antybiotyki i fagotypem u pacjentów indywidualnych i chorych z czyracznością rodzinną	60
4.6. Wyniki uzyskane przy pomocy metod genetycznych.....	62
4.7. Ocena wrażliwości szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> w stosunku do naturalnych peptydów antybakteryjnych	68
4.7.1. Poszukiwanie korelacji między wrażliwością badanych szczepów na antybiotyki i peptydy antybakteryjne.....	68
4.7.2. Badanie interakcji między peptydami oraz peptydami i antybiotykami	70
5. Omówienie i dyskusja.....	74
6. Wnioski	87
7. Streszczenie.....	88
8. Summary	90
9. Piśmiennictwo.....	92
Spis ilustracji.....	102
Spis tabel.....	104

Wykaz skrótów

ADSRRS-fingerprinting

(ang. *Amplification of DNA fragments Surrounding Rare Restriction Sites*) – amplifikacja fragmentów restrykcyjnych DNA

AMP

(ang. *antimicrobial peptides*) – peptydy antybakteryjne

CF

(ang. *clumping factor*) – czynnik zlepiający

CFU

(ang. *Colony Forming Units*) – jednostki tworzące kolonie

FIC

(ang. *Fractional Inhibitory Concentration*) – frakcjonowane stężenie hamujące

hBD3

(ang. *human beta defensin 3*) – ludzka beta defensyna 3

LL- 37

ludzka katelicydyna – peptyd antybakteryjny złożony z 37 aminokwasów

MBC

(ang. *minimal bactericidal concentration*) – minimalne stężenie bakteriobójcze

MIC

(ang. *minimal inhibitory concentration*) – minimalne stężenie hamujące

MLS_B

oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B

MRSA

(ang. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) – oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*

MSSA

(ang. *Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus*) – wrażliwy na metycylinę *Staphylococcus aureus*

NCCLS

(ang. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) – Narodowa Komisja do Klinicznych Standardów Laboratoryjnych

PCR

(ang. *polymerase chain reaction*) – polimerazowa reakcja łańcuchowa

PFGE

(ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) – elektroforeza pulsacyjna fragmentów restrykcyjnych

RAPD

(ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) – technika PCR umożliwiaująca wykrycie polimorfizmu genetycznego mikroorganizmów

RDA

(ang. *Radial Diffusion Assay*) - technika radiodyfuzji

RPM

(ang. *Rotation Per Minute*) – ilość obrotów na minutę

1. Wstęp

Czyraczność wywołwana przez *Staphylococcus aureus* jest schorzeniem stwarzającym wiele trudności terapeutycznych nie tylko ze względu na swój przewlekły i nawrotowy przebieg, ale również narastającą oporność drobnoustrojów na najczęściej stosowane w tej chorobie leki przeciwbakteryjne. Zmiany skórne mają charakter guzów zapalnych wypełnionych treścią ropną, często wymagających nacięcia, ewakuacji treści i antybiotykoterapii. Antybiotykoterapia ogólna stosowana w tej jednostce chorobowej często nie eliminuje jej całkowicie, przyczynia się natomiast do selekcji szczepów opornych. Przewlekła czyraczność powoduje nie tylko wiele problemów socjo - psychologicznych, ale również może być przyczyną szeregu niebezpiecznych dla życia powikłań (posocznica, zapalenie kości i stawów, zapalenie opon mózgowo - rdzeniowych, zespół wstrząsu toksycznego) [64]. Czynniki predysponujące do przewlekłego przebiegu choroby nie są do końca poznane [32]. Nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w jamie nosowo - gardłowej jest uznanym czynnikiem predysponującym do infekcji, jednakże spośród 35% populacji będącej nosicielem tego patogenu jedynie niewielki procent rozwija czyraczność [104]. Bieżące piśmiennictwo sugeruje, że w omawianym schorzeniu rzadko obserwuje się inne zaburzenia immunologiczne niż upośledzenie funkcji neutrofilów [86, 121]. Istnieją też prace, które nie potwierdzają danych wskazujących na zaburzenia funkcji neutrofilów w czyraczności [19, 74]. Jak dotychczas przeprowadzono niewiele badań dotyczących czyraczności w populacji polskiej. Problem podejmowany jest w nieco szerszym zakresie w literaturze światowej, jednakże nadal wiele kwestii wymaga wyjaśnienia. Konieczne jest więc poszukiwanie nowych, skutecznych metod leczenia dających trwały efekt terapeutyczny.

1.1. Charakterystyka ogólna *Staphylococcus aureus*

Po raz pierwszy *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) został wykryty w materiale ropnym przez Pasteura w 1880 r., a wyizolowany w czystej hodowli i bliżej opisany przez Rosenbacha w 1884 r. [65].

1.1.1. Morfologia

Gronkowce mają kształt kulisty, o średnicy 0.8-1 μm . Układają się (zwłaszcza w hodowli na podłożach stałych) w charakterystyczne, nieregularne skupienia przypominające winne grona – stąd nazwa gronkowce. W środowiskach naturalnych i podłożach płynnych często występują pojedynczo, w postaci dwoinek, czworaczków lub krótkich łańcuszków po 3-4 komórki. Barwią się Gram – dodatnio. Nie wytwarzają zarodników i nie wykazują ruchu; tylko nieliczne szczepy wytwarzają otoczki [72].

1.1.2. Budowa antygenowa

Gronkowce mają antygeny komórkowe i bardzo liczne antygeny pozakomórkowe (toksyny, enzymy i inne czynniki). Antygeny komórkowe występują przede wszystkim w ścianie komórkowej. Ściana komórkowa odgrywa ważną rolę w zjadliwości gronkowców, zawiera następujące składniki: peptydoglikan, kwas teichowy, białka A i B, clumping factor i inne bliżej nie zbadane czynniki. Szczepy zawierające otoczkę mają antygeny otoczkowe. U gronkowców wyróżniono:

1. Antygeny grupowe (wspólne dla *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*)
2. Antygeny gatunkowe (występujące u *Staphylococcus aureus*)
3. Antygeny typowe (na podstawie tych antygenów podzielono *Staphylococcus aureus* na typy serologiczne, stosując odczyn aglutynacji) [65].

1.1.3. Właściwości fizjologiczne

Gronkowce rosną na podłożach zwyczajnych w temperaturze 6.5 - 46°C, przy pH 4.2 – 9.3. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 30 - 37°C, optymalne pH 7.0 - 7.5. Są względnymi beztlenowcami, lepiej jednak rosną w warunkach tlenowych. W bulionie

tworzą jednolite zmętnienie i osad na dnie. Na agarze w ciągu 24 godzin powstają kolonie o średnicy 1 – 3 mm, okrągłe, wypukłe, gładkie, błyszczące, wilgotne, zwykle zabarwione na kolor żłocisty, pomarańczowy lub żółty. Zabarwienie w żółtych odcieniach nie zawsze występuje, czasami kolonie są białe. Wytwarzanie barwnika zależy od składu podłoża (mleko, węglowodany, sole nieorganiczne w większych stężeniach, glicerol, lipidy i inne związki stymulują wytwarzanie barwnika) i warunków hodowli (światło i temperatura 27 - 30°C sprzyjają wytwarzaniu barwnika) [65].

Gronkowce (zwłaszcza szczepy chorobotwórcze) cechuje wysoka aktywność biochemiczna dzięki wytwarzanym przez nie enzymom. Na agarze z krwią niektóre szczepy wywołują hemolizę beta. Wykazują dużą odporność na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych. Rosną w podłożach z dodatkiem 40% żółci i 15% NaCl. W temperaturze 60°C giną dopiero po półgodzinnym lub godzinnym ogrzewaniu. Wytrzymują działanie 1% roztworu fenolu przez 15 minut. Zabija je 2% roztwór fenolu i związki chloru. Wytrzymałe są na wysychanie; mogą przeżyć wiele tygodni poza ustrojem, zwłaszcza w obecności białka, np. w wyschniętej ropie na pościeli, w kurzu i w innych miejscach, do których nie dochodzą promienie słoneczne [67].

1.1.4. Czynniki chorobotwórczości gronkowca żłocistego

Tab. 1. Aktywność enzymatyczna *Staphylococcus aureus* [6, 125, 148].

Enzymy wytwarzane przez <i>Staphylococcus aureus</i>	Funkcja enzymu
acetoina	Decyduje o zjadliwości
hialuronidaza	Powoduje rozkład substancji międzykomórkowych przez co umożliwia w tkankach penetrację innych czynników chorobotwórczości
enterotoksyny A-F	Odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe
fosfataza	Determinuje patogenność
fosfolipaza	Decyduje o zjadliwości
katalaza	Rozkłada nadtlenek wodoru do tlenu i wody
koagulaza	Odpowiedzialna za krzepnięcie krwi
leukocydyny	Niszczą leukocyty chroniąc bakterie przed sfagocytowaniem
lipazy	Odgrywają szczególną rolę w patogenezie zmian ropnych na skórze

Enzymy wytwarzane przez <i>Staphylococcus aureus</i>	Funkcja enzymu
nukleazy	Odpowiedzialne za uszkodzenia kwasów nukleinowych
Penicylinaza	Odpowiedzialna za rozkład wiązania beta-laktamowego w podstawowej strukturze antybiotyków z grupy penicylin (beta-laktamowych)
Proteinazy	Odpowiedzialne za chorobotwórczość
Stafylokinaza	Rozpuszcza fibrynę

Tab. 2. Właściwości toksyn gronkowcowych [26].

Toksyna gronkowcowa	Funkcja
Toksyna α	Powoduje lizę erytrocytów i uszkadza płytki krwi
Toksyna β	Uszkadza erytrocyty
Toksyna γ	Uszkadza lizosomy
Toksyna epidermolityczna	Odpowiedzialna za uszkodzenia naskórka w gronkowcowym zespole oparzonej skóry (staphylococcal scaled skin syndrome – SSSS) i w liszajcu
Toksyny zespołu wstrząsu toksycznego 1 i 2	Odpowiedzialne za wstrząs toksyczny
Toksyna pirogenna	Odpowiedzialna za gorączkę

1.2. Identyfikacja *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Preparaty barwione metodą Grama

W preparatach barwionych, zarówno z hodowli bakteryjnej jak i materiałów klinicznych można stwierdzić obecność barwiących się Gram dodatnio ziarniaków układających się w grona (ryc. 7 i 8). Nie jest jednak możliwe odróżnienie gatunków saprofitycznych od chorobotwórczych (*Staphylococcus aureus*) [67].

1.2.2. Posiewy

Próbki materiału zawierające gronkowce, posiane na agarze z krwią tworzą typowe kolonie po 18 godzinach inkubacji w 37°C, jednak hemoliza i barwnik mogą pojawić się ze znacznym opóźnieniem. Materiał do posiewu zanieczyszczony innymi

drobnoustrojami można wysiewać na podłoża z dodatkiem 7.5% chlorku sodu. Obecność soli hamuje wzrost większości drobnoustrojów z wyjątkiem *Staphylococcus aureus* [67].

1.2.3. Próba na obecność koagulazy

Koagulaza ścina osocze krwi ludzkiej i króliczej w obecności swojego aktywatora. W wyniku interakcji koagulaza – aktywator powstaje związek podobny do trombiny, który z kolei działa na fibrynogen i przemienia go w fibrynę. W teście diagnostycznym jałowe osocze krwi króliczej w buforze cytrynianowym miesza się z jednorodną zawiesiną bakterii w wodzie. Pojawiający się w ciągu 1 – 6 godzin skrzep (odczyn dodatni) będący wynikiem aglutynacji świadczy o obecności *Staphylococcus aureus* [67].

1.2.4. Próba na obecność czynnika zlepiającego

Czynnik zlepiający (ang. *clumping factor* – CF) ścina fibrynogen bez udziału aktywatora, dlatego też test na obecność CF daje natychmiastowe wyniki. Rutynowo przeprowadza się go w wersji szkiełkowej, mieszając osocze królicze z wodną zawiesiną bakterii. Jeżeli badana zawiesina zawiera *Staphylococcus aureus* to w ciągu 30s powstają charakterystyczne wytrącenia [162].

1.2.5. Mikrotest Api Staph

Mikrotest stanowi zminiaturyzowaną wersję szeregu biochemicznego. Produkowany w formie paska z tworzywa, na którym znajduje się 20 mikropróbówek zawierających liofilizowane substraty. Zawiesinę czystej hodowli bakteryjnej, przeznaczoną do identyfikacji, rozlewa się do mikropróbówek i do niektórych z nich dodaje się (zgodnie z instrukcją) niezbędnych odczynników, również załączonych do zestawów diagnostycznych. Po 12 godzinach inkubacji w 37°C dokonuje się odczytu i porównuje wyniki z tabelą, według której ustala się przynależność badanego szczepu do gatunku [72].

1.2.6. Staphyslide – Test

Test ten opiera się na obecności białkowych receptorów błonowych, występujących u większości gronkowców koagulazo – dodatnich. Receptory te mają zdolność do wiązania się z fibrynogenem. W praktyce wykonanie testu polega na dodawaniu zawiesiny bakteryjnej do stabilizowanych krwinek czerwonych owcy, uaktywnionych fibrynogenem. Natychmiastowe powstanie strąków w wyniku aglutynacji jest odczytywane jako odczyn dodatni [72].

1.3. Metody fenotypowe identyfikacji gronkowca złocistego

Fenotypowe metody klasyfikacji opierają się na analizie zewnętrznych efektów ekspresji materiału genetycznego drobnoustrojów. Dotyczą one charakterystyki morfologicznej i metabolicznej mikroorganizmu, analizy cech biochemicznych, wrażliwości na bakteriofagi oraz oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki.

1.3.1. Profile oporności na antybiotyki

Analiza profili oporności jest jedną z najszerzej stosowanych metod fenotypowej analizy drobnoustrojów. Do oznaczania oporności mikroorganizmów na antybiotyki wykorzystuje się ilościowe i jakościowe testy wrażliwości z zastosowaniem techniki dyfuzyjno – krążkowej Kirby – Bauera, kolejnych rozcieńczeń i E – testów [67].

Metoda dyfuzyjno – krążkowa w agarze polega na zastosowaniu wystandaryzowanych (według zaleceń NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards) krążków bibuły nasączonych odpowiednimi ilościami antybiotyków. Antybiotyk dyfunduje promieniście do podłoża, tworząc gradient stężeń. Największa koncentracja antybiotyku występuje przy brzegach krążka i spada wraz z odległością. W ten sposób powstają strefy zahamowania wzrostu dla wysianej na podłoże zawiesiny drobnoustrojów. Miarą oporności badanego szczepu bakterii jest średnica strefy, na podstawie której charakteryzuje się drobnoustrój jako wrażliwy, średnio wrażliwy czy oporny. Wyniki uzyskane w ten sposób są często podstawą antybiotykoterapii celowanej stosowanej w leczeniu przewlekłej czyracości.

W metodzie kolejnych rozcieńczeń sporządza się seryjne rozcieńczenia antybiotyku w podłożu stałym lub płynnym. Każde rozcieńczenie charakteryzuje się takim samym inokulum, dzięki czemu można określić minimalne stężenie hamujące (MIC) dla zastosowanego antybiotyku. Wartość MIC jest miarą oporności badanego szczepu na antybiotyk.

Metoda E-testów jest metodą dyfuzyjno – rozcieńczeniową, preferowaną do oznaczania oporności wieloopornych szczepów bakteryjnych, np. MRSA. Oporność drobnoustroju na antybiotyk oznacza się za pomocą wystandaryzowanych pasków bibuły, na które naniesiony jest antybiotyk, w gradiencie stężeń wzdłuż paska.

Analiza profili oporności jest metodą wystandaryzowaną, dzięki czemu charakteryzuje się wysoką powtarzalnością i odtwarzalnością.

Polskie laboratoria diagnostyczne posługują się międzynarodowymi standardami NCCLS. Do wykonania analizy oporności drobnoustroju nie jest konieczna żadna specjalistyczna aparatura, co pozwala na wykonanie analizy w każdym laboratorium.

Należy jednak zauważyć, że analiza oporności na antybiotyki jest metodą identyfikacji o niskiej sile różnicującej. Związane jest to utratą lub nabywaniem oporności na drodze plazmidowej. Przekazywanie genów oporności niesionych przez plazmidy może tłumaczyć różnice we wzorach oporności dla szczepów tego samego klonu.

Z tego względu technika typowania przy pomocy analizy profili oporności nie może być jedyną metodą oceny epidemiologicznej szczepów.

1.3.2. Typowanie bakteriofagowe

Odminną metodą fenotypową stosowaną do różnicowania szczepów *Staphylococcus aureus* jest typowanie przy pomocy bakteriofagów. Typowanie oparte jest na określaniu wrażliwości szczepu na międzynarodowy zestaw fagów.

Bakteriofagi zostały zaklasyfikowane do V grup głównych (tab. 3) na podstawie których określana jest grupa wrażliwości badanego szczepu.

Tab. 3. Podstawowy zestaw fagów stosowany w typowaniu *Staphylococcus aureus*.

Grupa fagowa	Bakteriofagi
I	29 52 52A 78 80
II	3A 3B 3C 55 71
III	6 7 42C 42E 47 53 54 71 75 76 77 83A
IV	42D
V	94 96

Od lat 80-tych w Polsce utrzymuje się stała dominacja szczepów gronkowca należących do II-ej grupy fagowej [110]. Mimo standaryzacji metoda typowania bakteriofagami ma pewne ograniczenia. Badania wykazują, że większość szczepów MRSA nie typuje się za pomocą podstawowego zestawu fagów [80].

1.3.3. Zymotypy

Typowanie oparte na analizie zymotypów polega na rozdziale elektroforetycznym produktów hydrolizy określonych substratów, np. octanu α -naftyli, octanu indoksyli przez wewnątrzkomórkowe esterazy komórkowe. Oznaczanie zymotypów znajduje zastosowanie w diagnostyce epidemiologicznej do typowania różnych gatunków bakterii, w tym *Staphylococcus aureus*. Dowiedziono możliwość zastosowania tej metody do różnicowania szczepów gronkowca złocistego (w tym szczepów MRSA) nie typowalnych podstawowym zestawem fagów [16].

1.4. Metody genotypowe stosowane w typowaniu *Staphylococcus aureus*

Genotypowe metody typowania drobnoustrojów opierają się na analizie materiału genetycznego, który jest unikalny i niezmienny dla każdego organizmu, w przeciwieństwie do cech fenotypowych. Można je zastosować do badania wszystkich organizmów, dla których hodowla w warunkach laboratoryjnych jest utrudniona, bądź nie jest możliwe różnicowanie ich metodami fenotypowymi.

Różnice między genomami szczepów tego samego gatunku bakterii mogą być wynikiem rekombinacji materiału genetycznego i mutacji powstałych w skutek błędów replikacji.

Do badania zmienności genetycznej stosowane są techniki biologii molekularnej m.in. analiza wielkości chromosomów, trawienie restrykcyjne genomu lub plazmidów i rozdział elektroforetyczny jego produktów. Wykorzystuje się także sondy molekularne do odnajdywania sekwencji repetytywnych, lub analizowane DNA poddaje się sekwencjonowaniu.

W literaturze światowej donosi się o wielu różnych metodach identyfikacji i różnicowania szczepów gronkowca złocistego [158].

1.4.1. Analiza profili plazmidowych

Typowanie profili plazmidowych (ang. *PPA- Plasmid Profile Analysis*) jest metodą genotypowania polegającą na izolacji i rozdziale elektroforetycznym DNA plazmidowego. W zależności od wielkości i ilości plazmidów w komórce bakterii otrzymuje się charakterystyczne wzory plazmidowe.

Metodę można poszerzyć o etap trawienia restrykcyjnego plazmidowego DNA, co pozwala na dalsze różnicowanie tych szczepów.

Analiza profili plazmidowych jest metodą czułą, swoistą i nieskomplikowaną w wykonaniu. Znalazła zastosowanie jako narzędzie epidemiologiczne do typowania szczepów MSSA (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*) i MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). Metoda jest jednak ograniczona do szczepów posiadających plazmid. Przy zastosowaniu tej techniki należy uwzględnić zdolność bakterii do spontanicznego nabywania i tracenia plazmidów [158].

1.4.2. Analiza restrykcyjna DNA chromosomalnego w połączeniu z elektroforezą plusową (RFLP/PFGE)

Analiza polimorfizmu długości fragmentów traktowana jako metoda „złotego standardu” w molekularnym typowaniu bakterii znalazła zastosowanie w typowaniu szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus*. Technika opiera się na analizie restrykcyjnej (ang. *REA - Restriction Enzyme Analysis*) DNA poddanego trawieniu enzymami restrykcyjnymi.

W wyniku trawienia endonukleazami otrzymuje się fragmenty DNA o wielkości od 0.5 kbp do 1000 kbp. Liczba oraz wielkość otrzymanych fragmentów zależy od charakteru trawionego DNA (składu nukleotydowego- % stosunku zawartości par G+C do A+T) oraz długości sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny. W badaniach nad *Staphylococcus aureus* wykorzystuje się enzymy rzadko tnące (np. *SmaI*) co pozwala na różnicowanie genotypów, na podstawie 10 - 15 fragmentów restrykcyjnych [93].

Produkty trawienia rozdzielane są w żelu agarozowym w pulsowym polu elektrycznym (ang. *PFGE-Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Mimo wysokiego potencjału dyskryminującego metoda ma pewne ograniczenia. Najistotniejszym czynnikiem ograniczającym jest czas potrzebny na wykonanie analizy,

procedura zabiera bowiem od 2 do 3 dni. Poza tym wymóg skomplikowanej aparatury i zachowania stałych warunków analizy powoduje, że metoda ta nie jest stosowana do rutynowych badań.

Dodatkową wadą tej metody jest trudność interpretacji wzorów restrykcyjnych. Zachodzenie na siebie, pokrywanie się fragmentów o zbliżonej wielkości oraz pojawianie się we wzorze fragmentów pochodzących z plazmidowego DNA mogą powodować zafałszowanie wyników. Czynnikiem ograniczającym są również wysokie koszty analizy [93].

1.4.3. Metody genotypowania oparte o reakcję PCR

Rozwinięta w latach osiemdziesiątych technika PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction PCR*) naśladująca zjawisko replikacji DNA *in vivo* stała się jedną z podstawowych technik badawczych i diagnostycznych.

Technika ta stosowana jest do amplifikacji określonych fragmentów badanego DNA przy użyciu odpowiednio skonstruowanych oligonukleotydów-starterów.

Kolejnym etapem analizy jest ocena liczby i wielkości zamplifikowanych fragmentów na podstawie rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR [159].

Techniki PCR znalazły szeroki zastosowanie w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej do:

- wykrywania drobnoustrojów;
- identyfikacji drobnoustrojów na poziomie gatunku i szczepu oraz
- określania powiązań filogenetycznych.

Dzięki zaletom takim jak czułość i szybkość analizy technika PCR – w różnych wariantach- jest stosowana przez laboratoria i ośrodki naukowe.

1.4.3.1. Amplifikacja znanych regionów genomu połączona z analizą restrykcyjną (PCR/RFLP)

Połączenie techniki amplifikacji materiału genetycznego z analizą restrykcyjną pozwoliło na analizę filogenetyczną, identyfikację do gatunku, oraz różnicowanie na poziomie szczepów.

Jako cel molekularny w łańcuchowej reakcji polimerazy wybiera się sekwencję DNA specyficzną dla danego gatunku, a następnie uzyskane produkty amplifikacji poddaje trawieniu restrykcyjnemu.

Taka procedura prowadzi do otrzymania specyficznego dla badanego szczepu polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych.

W badaniach nad *Staphylococcus aureus* podejmowano próby różnicowania szczepów na podstawie amplifikacji fragmentów genów koagulazy (*coa*) i proteiny A (produktu genu *spa*). Uzyskane produkty amplifikacji trawiono enzymami restrykcyjnymi *HaeII* i *AluI*.

Uzyskane wyniki pozwoliły na zróżnicowanie badanej kolekcji szczepów MRSA, a metoda zyskała uznanie laboratoriów badawczych jako dobrze powtarzalna, cechująca się wysoką siłą dyskryminacji oraz łatwością w interpretacji wyników [158].

1.4.3.2. Amplifikacja losowych fragmentów DNA (AP PCR, RAPD, DAF)

W 1990 roku opisana została technika typowania molekularnego związana z amplifikacją losowych fragmentów genomu bakteryjnego.

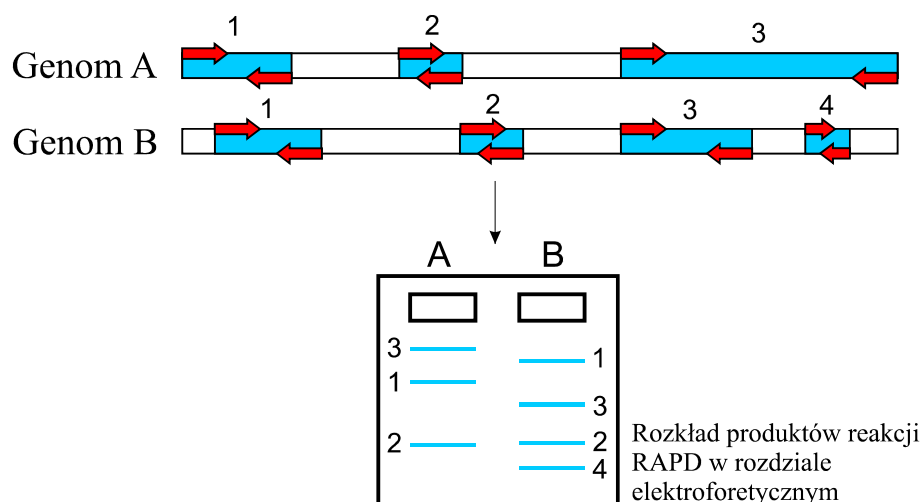
Teoretyczne podstawy metody opierają się na zastosowaniu startera (starterów), który łączy się losowo z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami bakteryjnego DNA. Amplifikacja w reakcji PCR powoduje powstanie określonego profilu genotypowego, pozwalającego na analizę i porównanie izolatów.

W odmianie metody zwanej AP-PCR (ang. *Arbitrary Primed PCR*) używa się jednego 6-8 nt startera, w RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) często stosuje się 2, 3 i więcej 9-10 nukleotydowych starterów o dowolnej sekwencji.

Uzyskane w ten sposób wyniki cechują się bowiem większą powtarzalnością, a większa liczba amplikonów pozwala na wnikliwsze różnicowanie szczepów.

Zarówno AP jak i RAPD znalazły zastosowanie do szybkiego różnicowania szczepów *Staphylococcus aureus*.

Możliwość zautomatyzowania metody i jej wysoka siła dyskryminacji oraz relatywna szybkość i łatwość wykonania spowodowały, że stała się niezwykle użyteczna w badaniach epidemiologicznych. Cechują ją jednak pewne ograniczenia, wynikające z niskiej odtwarzalności uzyskiwanych wyników w różnych laboratoriach [158].



Ryc. 1. Strategia metody RAPD. Wykorzystanie jednego startera (czerwona strzałka) niespecyficznie przyłączającego się do wielu miejsc w DNA. Pozwala na uzyskanie specyficznego wzoru różnicującego badane genomy (A i B).

1.4.3.3. Multipleks PCR

Odmiana techniki PCR określana jako multipleks (złożony) PCR polega na równoczesnej amplifikacji dwóch lub większej liczby różnych fragmentów DNA w jednej mieszaninie reakcyjnej.

Amplifikacja wybranych regionów możliwa jest dzięki zastosowaniu wielu par starterów, determinujących amplifikację produktów różnej długości. Celem molekularnym są najczęściej geny specyficzne dla danego gatunku drobnoustroju oraz fragmenty genomowego DNA odpowiedzialne za czynniki wirulencji szczepu w obrębie gatunku.

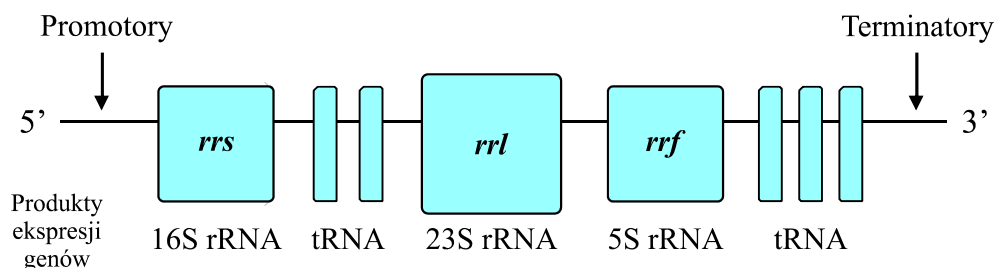
Przykładem takiego układu diagnostycznego jest test oparty na różnicowaniu szczepów gronkowca złocistego.

Opracowany układ pozwala na identyfikację *Staphylococcus aureus* oraz oznaczenie jego oporności na metycylinę. Możliwe jest to dzięki równoległej amplifikacji fragmentu genu *nuc*, specyficznego dla gatunku *Staphylococcus aureus*, oraz genu *mecA* determinującego oporność na metycylinę dla szczepów MRSA [46].

1.4.3.4. Rybotypowanie

Różnicowanie mikroorganizmów opiera się często na genach kodujących rybosomalny RNA (rRNA) małej i dużej podjednostki rybosomu. Geny te, ułożone w operon *rrn* są charakterystyczne dla wszystkich organizmów bakteryjnych. Między sekwencjami odpowiedzialnymi za syntezę podjednostek rybosomalnych 16S, 23S i 5S

rRNA występują regiony polimorficzne o zróżnicowanej wielkości i sekwencji. Te regiony operonów stanowią doskonały cel molekularny wykorzystywany w badaniach filogenetycznych.



Ryc. 2. Organizacja operonu rybosomalnego rrr u Procariota.

Różnicowanie bakterii z zastosowaniem metod rybotypowania można przeprowadzić z zastosowaniem klasycznych metod hybrydacyjnych oraz technik PCR.

Nowoczesne techniki rybotypowania wykorzystują element amplifikacji wybranych regionów operonu *rrr* w reakcji PCR, głównie:

- polimorficznych sekwencji pomiędzy genami *rrs* i *rrl*- technika ITS PCR (ang. *Internal Transcribed Spacer*)
- wewnętrznego regionu zmiennego genu kodującego podjednostkę 16S rRNA
- regionu zawierającego geny *rrs* i *rrl* oraz rozdzielającego je fragmentu polimorficznego
- regionu kodującego tRNA

Wielokrotnie wykorzystuje się analizę restrykcyjną amplifikowanych fragmentów operonu rybosomalnego, w tzw. technice ARDRA (ang. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Takie podejście pozwala na zwiększenie potencjału różnicującego metody.

Techniki rybotypowania znalazły zastosowanie do różnicowania szczepów klinicznych MRSA [158].

1.4.3.5. Techniki fingerprinting

Wspólną cechą wszystkich odmian techniki fingerprinting jest powielenie polimorficznego regionu DNA w reakcji PCR z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów. Startery są zwykle krótkie i mają dowolnie dobraną sekwencję, w związku z czym przyłączają się z niską specyficznością w wielu miejscach genomu.

Dzięki temu uzyskuje się unikalny wzór prążków (od kilku do około 100), tak zwany „odcisk palca” (ang. *fingerprinting*), co pozwala na uwidocznienie różnic genetycznych pomiędzy spokrewnionymi ze sobą organizmami, np. szczepami tego samego gatunku.

1.4.3.5.1. Rep - PCR

Celem molekularnym w technice PCR-fingerprinting mogą być repetytywne sekwencje występujące w genomie mikroorganizmów w wielu kopiach.

Najwcześniej zostały one odkryte i opisane u *Enterobacteriaceae*. Przykładem takiego regionu polimorficznego są 38- nukleotydowe sekwencje REP (ang. *Repetitive Extragenic Palindroms Elements*) u *Escherichia coli*, czy 126-nukleotydowe sekwencje ERIC (ang. *Enterobacterial Repetitive Intregenic Consensus*) charakterystyczne dla genomów bakterii Gram- ujemnych [127].

Dla typowania *Staphylococcus aureus* można wykorzystać obecność w genomie tandemowych sekwencji repetytywnych (VNTR, ang. Variable- Number Tandem Repeat), wśród nich regionów genów *ssp*, *coa*, *spa*, *sdr* [149]. Jednoczesna amplifikacja tych regionów w reakcji PCR pozwala na uzyskanie specyficznych profili, na podstawie których różnicowane są szczepy bakterii.

Technika Rep-PCR jest szybką metodą wstępnego typowania bakterii. Charakteryzuje się wyższą siłą dyskryminacji w porównaniu do analizy profili plazmidowych, czy technik fingerprinting zastosowanych dla całego genomu, a nawet analizy restrykcyjnej regionu 16S rRNA.

1.4.3.5.2. AFLP

Metoda AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) jest jedną z odmian techniki PCR-fingerprinting. Opiera się ona na analizie całego genomu mikroorganizmu i jest stosowana do badań różnego typu DNA bez względu na jego pochodzenie i stopień skomplikowania.

Połączenie dwóch metod – RFLP oraz selektywnej amplifikacji PCR pozwala na zastosowanie jej jako narzędzia w badaniach taksonomicznych i epidemiologicznych.

Strategia metody polega na selektywnej amplifikacji odpowiednio przygotowanych fragmentów DNA genomowego.

Przygotowanie fragmentów do reakcji PCR obejmuje etap trawienia totalnego DNA przy użyciu dwóch racjonalnie dobranych enzymów restrykcyjnych oraz reakcji ligacji produktów trawienia z adaptorami.

Produkty reakcji ligacji poddaje się selektywnej amplifikacji z użyciem pary starterów homologicznych do sekwencji adaptor- miejsce restrykcyjne. Istotą metody jest ograniczenie liczby produktów reakcji PCR w wyniku zjawiska supresji, a czynnikiem ograniczającym amplifikację jest niekomplementarność startera na 3`końcu.

Mimo takich warunków w wyniku amplifikacji powstaje duża liczba produktów, co czyni elektroforogramy trudnymi do interpretacji.

Najistotniejszymi zaletami techniki AFLP są wysoka siła dyskryminacji, wysoka powtarzalność i odtwarzalność wyników, możliwość częściowej automatyzacji, oraz tworzenia bazy danych na podstawie komputerowej analizy wyników [95].

1.4.3.5.3. ADSRRS - fingerprinting (ang. *Amplification of DNA fragments Surrounding Rare Restriction Sites*)

Jedną z obiecujących metod genotypowania opartych na reakcji PCR jest ADSRRS-fingerprinting. Jest to nowa technika, wykorzystująca zjawisko supresji (zahamowania) amplifikacji fragmentów DNA.

Procedura wykonania typowania szczepu bakterii złożona jest z czterech głównych etapów:

- trawienie genomowego DNA przy użyciu dwóch odpowiednio dobranych enzymów restrykcyjnych (enzymu rzadko RC i enzymu często tnącego FC w obrębie badanego genomu)
- ligacja fragmentów restrykcyjnych z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami
- selektywna amplifikacja produktów ligacji
- elektroforeza poliakrylamidowa produktów reakcji PCR.

Wyizolowane z mikroorganizmu genomowe DNA poddawane jest trawieniu enzymatycznemu z zastosowaniem dwóch racjonalnie dobranych restryktaz.

Jeden z pary enzymów (tzw. często tnący) rozpoznaje sekwencję, która powtarza się setki razy w obrębie badanego genomu. Sekwencja rozpoznania dla drugiego enzymu (rzadko tnącego) obecna jest w genomie w kilkunastu lub kilkudziesięciu powtórzeniach.

W wyniku jednoczesnego trawienia totalnego DNA tymi enzymami powstają trzy rodzaje produktów trawienia, o zróżnicowanej długości i lepkich końcach.

Najliczniejszą grupę reprezentują fragmenty powstałe w skutek trawienia enzymem często tnącym. Kolejną, co do ilości produktów grupą jest pula fragmentów zakończonych dwoma różnymi wiszącymi końcami, z których jeden powstał w wyniku reakcji trawienia restryktazą rzadko tnącą, a drugi często tnącą. Trzecią, najmniej liczną grupę stanowią fragmenty genomowego DNA powstałe po trawieniu enzymem rzadko tnącym w obrębie genomu.

Mieszanie fragmentów DNA poddaje się następnie reakcji ligacji z odpowiednio przygotowanymi adaptorami. Wykorzystuje się dwa rodzaje adaptorów-oligonukleotydów- o różnej długości. Adaptory krótki (ang. *short*) i długi (ang. *long*) powstałe w wyniku hybrydyzacji oligonukleotydów ligowanego i pomocniczego.

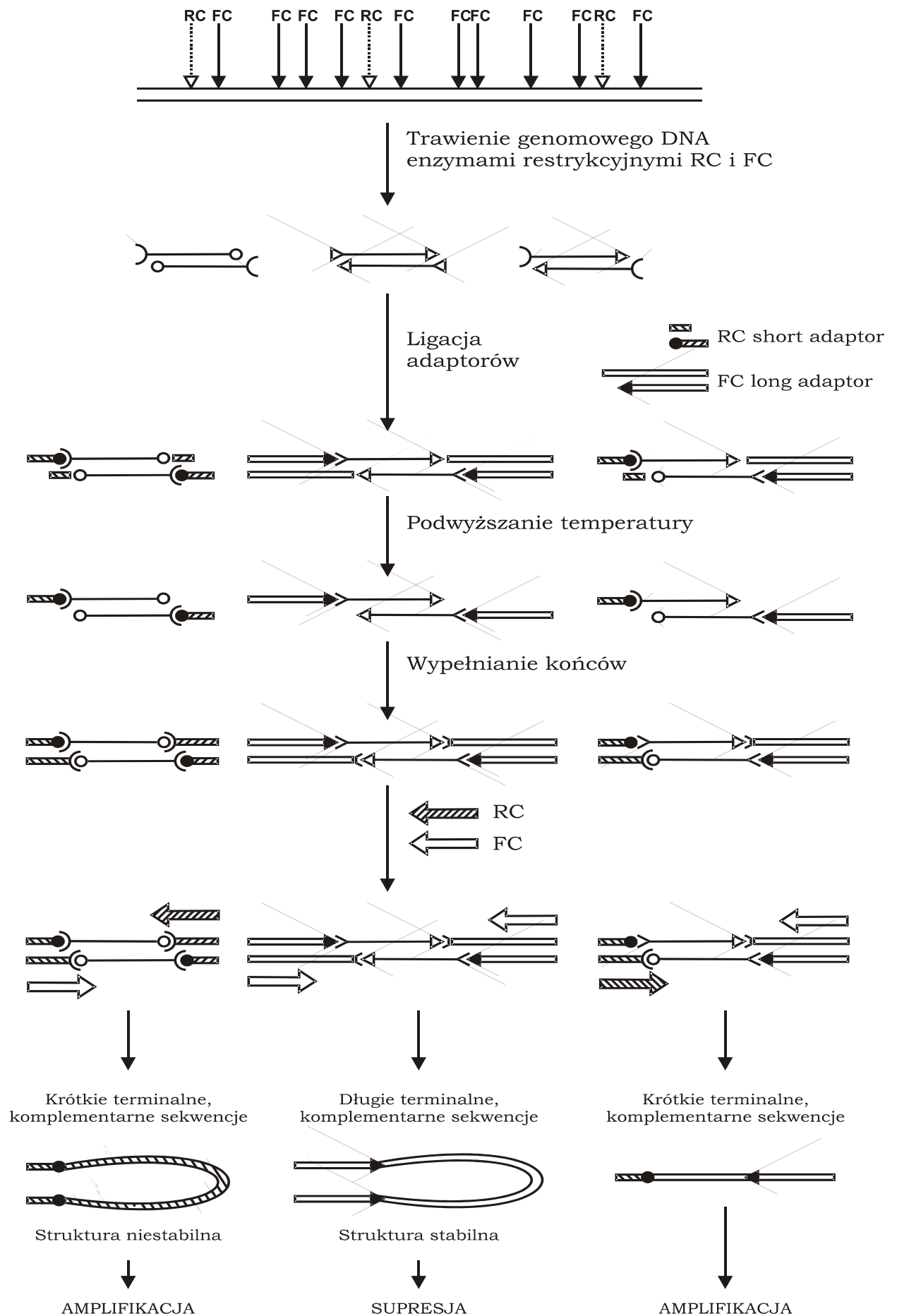
W wyniku reakcji ligacji dochodzi do modyfikacji końców restrykcyjnych powstałych po trawieniu enzymatycznym genomowego DNA. Otrzymuje się trzy grupy produktów, z przyłączonymi na 5' końcu adaptorami:

- short, po obu stronach fragmentu powstałego po trawieniu enzymem często tnącym
- long, po obu stronach fragmentu powstałego po trawieniu enzymem rzadko tnącym
- long po jednej stronie, i short po drugiej stronie fragmentu otrzymanego przez trawienie parą enzymów RT i FC

Produkty ligacji poddaje się amplifikacji w reakcji PCR z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów, komplementarnych do sekwencji adaptorów. W pierwszym etapie reakcji PCR dzięki aktywności polimerazy DNA następuje wypełnianie 3' końców, a w dalszych etapach właściwa amplifikacja fragmentów DNA. Istota metody ADSRRS-fingerprinting opiera się na ograniczeniu ilości powstających produktów reakcji PCR. Ograniczenie to jest wynikiem supresji, związanej ze zjawiskiem wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji fragmentów homologicznych.

Hybrydyzacji takiej ulegają produkty ligacji zawierające sekwencje długiego adaptoru na obu końcach. W jej wyniku powstaje stabilna struktura „rakiety tenisowej”, uniemożliwiająca przyłączanie startera do komplementarnej sekwencji, a tym samym amplifikację fragmentu DNA.

Struktura rakiety tenisowej powstaje również w przypadku produktów ligacji DNA z krótkim adaptorem na obu końcach. W tym przypadku zachodzi jednak efektywna amplifikacja fragmentów. Powstająca w wyniku wewnątrzcząsteczkowej hybrydyzacji struktura jest bowiem niestabilna, ze względu na zbyt krótką sekwencję homologiczną.



Ryc. 3. Przebieg reakcji ADSRRS-fingerprinting.

Prawidłowa amplifikacja fragmentów zachodzi także w przypadku produktów ligacji z dwoma różnymi adaptorami. W ich sekwencji brak jest fragmentów homologicznych, które mogłyby hybrydyzować ze sobą i ograniczać przyłączanie starterów. W efekcie selektywnej amplifikacji następuje ograniczenie liczby produktów reakcji PCR. Ułatwia to znacznie interpretację wyników, analizę i różnicowanie szczepów bakteryjnych [96].

Zastosowano ją do genotypowania szczepów klinicznych *Serratia marcescens* [79] oraz wankomycynoopornych izolatów *Enterococcus faecium* [78].

W prezentowanej pracy po raz pierwszy zastosowano ją do typowania szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową.

1.5. Rola *Staphylococcus aureus* w chorobach skóry

Staphylococcus aureus jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym ropnych chorób skóry. Wytwarza on szereg enzymów i toksyn zwiększających jego inwazyjność w stosunku do skóry. Nosicielstwo tego drobnoustroju w jamie nosowo-gardłowej jest często pierwszym etapem w rozwoju infekcji. Najczęściej spotykaną cechą zakażeń gronkowcami jest proces ropny i jego umiejscowienie. Zazwyczaj opisywaną drogą inwazji tych bakterii do organizmu są wrota zakażenia zlokalizowane w skórze i błonach śluzowych, szczególnie w miejscach uszkodzenia tkanek. Do najczęstszych chorób należą zakażenia skórne charakteryzujące się intensywnym, ropnym zapaleniem z miejscową martwicą tkanki, a także zapalenia dróg oddechowych czy zapalenie zatok [75]. *Staphylococcus aureus* posiada liczne struktury powierzchniowe, które dzięki wiązaniu się z białkami surowicy i macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwiają mu przyleganie i w następstwie kolonizację tkanek żywiciela [36]. Częściowo poznano już i opisano mechanizmy oddziaływań gronkowców z immunoglobulinami [154], fibrynogenem [13] i szeregiem innych białek [150]. Udowodniono również, że zarówno białko A, będące integralnym białkiem błonowym *Staphylococcus aureus*, jak i jego cukrowa otoczka wpływają hamująco na fagocytozę gronkowców przez wielojądrowe krwinki białe [117]. Ponadto wytwarzanie przez te bakterie dużej liczby produktów sekrecyjnych o charakterze enzymów i toksyn wysoko aktywnych biologicznie, pozwala gronkowcom nie tylko na wnikięcie do organizmu gospodarza i oportunistyczną kolonizację jego tkanek, ale także na ich efektywne uszkodzenie [5, 37, 40]. Wykazanie w ostatnich latach

biologicznego działania egzotoksyn, enterotoksyn i toksyny wstrząsu toksycznego, charakterystycznego dla superantygenów, świadczy o wyjątkowej zjadliwości *Staphylococcus aureus* wśród innych drobnoustrojów.

Do chorób skóry o etiologii gronkowcowej zalicza się:

- zapalenie mieszków włosowych
- figówka
- czyraczność (ryc. 4 i 5)
- liszajec pęcherzowy
- ropnie mnogie pach
- ropnie mnogie niemowląt
- zapalenie pęcherzowe i złuszczone skóry noworodków



Ryc. 4. Czyrak w okolicy prawej pachy.

W liszajcu pęcherzowym oraz w zapaleniu pęcherzowym i złuszcżającym skóry noworodków niewątpliwą rolę patogenetyczną odgrywa toksyna epidermolityczna, podczas gdy w czyraczności czy zapaleniu mieszków włosowych nie stwierdzono jednoznacznie czynnika, który byłby odpowiedzialny za indukcję zmian. Uważa się, że jest za to odpowiedzialny zespół enzymów i toksyn [104].



Ryc. 5. Liczne czyraki na skórze brzucha.

1.6. Mechanizmy oporności *Staphylococcus aureus* na środki przeciwbakteryjne

1.6.1. Mechanizmy genetyczne warunkujące oporność gronkowców na środki przeciwdrobnoustrojowe

Drobnoustroje mają zdolność obrony przed szkodliwymi substancjami jak np. antybiotyki, środki dezynfekcyjne czy sole metali. Oporność ta może być warunkowana w różny sposób. W niektórych przypadkach może powstać w wyniku spontanicznej mutacji w szczepie, bez kontaktu z chemioterapeutykami. Bakteryjne antybiotykooporne mutanty spontaniczne mogą powstawać w środowisku naturalnym jak i w warunkach laboratoryjnych z częstotliwością 10^{-6} do 10^{-8} na komórkę. Oporność gronkowców na takie antybiotyki jak np. fluorochinolony, mupirocyna, trimetoprim, streptomycyna, rifampicyna czy kwas fusydowy może być spowodowana np. mutacjami odpowiednich genów chromosomalnych lub nabyciem przez bakterie odpowiednich plazmidów [89]. Przy stosowaniu środków przeciwdrobnoustrojowych obserwuje się

zjawisko oporności krzyżowej. Dotyczy ono głównie substancji należących do jednej grupy chemicznej, ale czasem spotykane jest także w przypadku różnych związków (np. chlorheksydyna, amidy i IV-rzędowe związki amoniowe). Istotną rolę odgrywa również sprzężenie genów w obrębie jednego elementu – plazmidu czy transpozonu. Przykładem może być obecność u *Staphylococcus aureus* genów oporności na IV-rzędowe związki amoniowe (*qac*) na tzw. plazmidach gentamycynowych i penicylinazowych. Jest to zjawisko bardzo niekorzystne, gdyż coraz szersze stosowanie chemioterapeutyków prowadzi do równoczesnego zwiększenia oporności na środki dezynfekcyjne wśród drobnoustrojów [89].

Bezpośrednią przyczyną oporności bakterii na różnego rodzaju związki jest obecność i ekspresja odpowiednich genów w komórce. Oporność konstytutywna jest związana z ciągłą ekspresją odpowiednich genów, natomiast indukcyjna może być inicjowana obecnością antybiotyków. Geny oporności na różne związki przeciwbakteryjne mogą być zlokalizowane na chromosomie, a także na elementach pozachromosomalnych takich jak plazmidy czy transpozony [39].

Plazmidy są to cząsteczki DNA zdolne do samodzielnej replikacji w komórkach bakteryjnych i dziedziczone niezależnie od chromosomu. Oprócz genów odpowiedzialnych za niezależną replikację i genów regulatorowych, plazmidy mogą zawierać szereg genów odpowiedzialnych za różne cechy fenotypowe bakterii np. oporność na związki przeciwbakteryjne, zdolność do koniugacji czy produkcji toksyn. Większość naturalnie występujących szczepów *Staphylococcus aureus* posiada jeden lub kilka plazmidów. Plazmidy gronkowcowe zostały podzielone na trzy podstawowe klasy oraz prowizoryczną klasę czwartą, zawierającą plazmidy nie dające się sklasyfikować w żadnej z trzech pierwszych [107, 115].

Klasa I zawiera małe plazmidy (1.3-4.6 kbp; 1 kbp oznacza tysiąc par zasad), występujące w 10-50 kopiach na komórkę, zawierają najczęściej jedną, rzadko dwie determinanty oporności. Należą tu plazmidy warunkujące oporność na chloramfenikol, tetracykliny, aminoglikozydy, kationy kadmu, IV-rzędowe związki amoniowe, makrolidy, linkozamidy i streptograminy B.

Plazmidy klasy II są większe (15-46 kbp) i występują w mniejszej liczbie kopii na komórkę (4-6). Należą tu między innymi liczne plazmidy penicylinazowe, które oprócz genów odpowiedzialnych za produkcję β -laktamaz, zawierają także różne kombinacje genów oporności na jony metali ciężkich (kadm, arseniany, arseniny,

antymon, bizmut, rtęć), a także plazmidy warunkujące oporność na aminoglikozydy i trimetoprim.

Do klasy III należą duże plazmidy (30-60 kbp) koniugacyjne zawierające często determinanty oporności na aminoglikozydy, mupirocynę i środki dezynfekcyjne.

Transpozony oraz sekwencje insercyjne należą do genetycznych elementów translokacyjnych, mogą przenosić się w obrębie tego samego replikonu (chromosomu lub plazmidu) albo pomiędzy replikonami [39]. Na transpozonach zlokalizowane są geny warunkujące zdolność do transpozycji oraz szereg genów strukturalnych kodujących np. produkcję enzymów, toksyn, oporność na leki czy zdolność do koniugacji.

1.6.2. Oporność *Staphylococcus aureus* na antybiotyki

1.6.2.1. Inaktywacja enzymatyczna

W inaktywacji antybiotyków biorą udział najczęściej enzymy z grupy hydrolaz lub transferaz. Większość izolowanych szczepów *Staphylococcus aureus* (80-90%) ma zdolność do produkcji indukowanej beta-laktamazy pochodzenia plazmidowego, co prowadzi do wystąpienia oporności na penicylinę/ampicylinę. Z tego względu w zakażeniach pozaszpitalnych stosuje się penicyliny półsyntetyczne odporne na penicylinazę gronkowcową oraz cefalosporyny I i II generacji [162]. Produkcja β -laktamaz u gronkowców złocistych kodowana jest najczęściej przez geny zlokalizowane na plazmidach i w transpozonach, rzadziej w chromosomie, dlatego też jest cechą łatwo przekazywaną pomiędzy szczepami. Większość plazmidów kodujących β -laktamazę należy do II klasy plazmidów występujących u *Staphylococcus aureus* [99]. Inaktywacja chloramfenikolu u szczepów *S. aureus* opornych na ten lek odbywa się na drodze unieczynniania go przez acetylazę chloramfenikolową. Kodowana jest wyłącznie przez grupę małych wielokopiiowych plazmidów.

Najczęstszym mechanizmem oporności gronkowców na aminoglikozydy jest modyfikacja antybiotyków przez enzymy komórkowe: acetylotransferazy, fosfotransferazy i nukleotydylotransferazy. Determinanty tej oporności zlokalizowane są zwykle na większych plazmidach o małej liczbie kopii. Na plazmidach penicylinazowych mogą znajdować się determinanty oporności na niektóre aminoglikozydy [89, 99].

1.6.2.2. Zmiana powinowactwa do leku lub dublowanie funkcji miejsca docelowego

Mutacja w obrębie genu kodującego białko stanowiące cel dla antybiotyku może wywołać zmniejszenie jego powinowactwa do wiązania się z antybiotykiem. Przykładem tego jest mutacja genów kodujących gyrazę lub inne topoizomerazy bakteryjne, będąca przyczyną oporności bakterii na chinolony, a także mutacje genów odpowiedzialnych za białka wiążące penicyliny powodujące obniżenie powinowactwa antybiotyków β -laktamowych do tych białek i w konsekwencji oporność na te antybiotyki. Mutacje w obrębie genów kodujących odpowiednie enzymy mogą także decydować o oporności bakterii na trimetoprim, sulfonamidy, mupirocynę lub rifampicynę.

O jednym z mechanizmów oporności *S. aureus* na antybiotyki aminoglikozydowe może decydować mutacja w genie kodującym białko rybosomalne, prowadząca do zmian w strukturze rybosomu i w efekcie do uniemożliwienia wiązania antybiotyku. Mechanizm ten wykryto u izolatów klinicznych *Staphylococcus aureus* o wysokim poziomie oporności na streptomycynę [89].

Oporność gronkowców na kwas fusydowy powstaje na skutek mutacji w komórce drobnoustroju, która powoduje zmniejszenie powinowactwa miejsca docelowego (czynnika elongacji) do leku. Znacznie rzadziej występują dające tego typu oporność determinanty zlokalizowane na plazmidach penicylinazowych lub plazmidach kodujących oporność na aminoglikozydy.

Niski poziom oporności gronkowców na mupirocynę jest wynikiem mutacji genu kodującego syntetazę izoleucylo-tRNA. Oporność na wysokie stężenia mupirocyny jest wynikiem nabycia przez szczepy plazmidu niosącego gen *mupA*, kodujący syntetazę izoleucylo-tRNA o bardzo niskim powinowactwie do mupirocyny. Jest on znajdowany w różnych, często niespokrewnionych plazmidach. Wykryto także szczepy, u których kopia tego genu jest zlokalizowana w chromosomie [90, 120].

Najpowszechniejszym mechanizmem oporności gronkowca złocistego na fluorochinolony jest zmiana miejsca docelowego dla tych związków. Jest ona spowodowana mutacjami w genie *gyrA*, który koduje podjednostkę A gyrazy (topoizomerazy II) i *grlA* (topoizomerazy IV), stanowiące cel ataku tej grupy leków. Oporność ta jest konstytutywna [143].

Oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminę B (tzw. MLS_B) spowodowana jest enzymatyczną modyfikacją miejsca docelowego przez metylazy (*Erm*). Indukcyjna oporność typu MLS_B u *Staphylococcus aureus* może być kodowana przez

małe, wielokopiowe plazmidy (niosące gen *ermC*) lub chromosomalnie (gen *ermA* zlokalizowany na transpozonie Tn554). Konstytutywna oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B jest kodowana plazmidowo (gen *ermC* w małych plazmidach oraz gen *ermB* zlokalizowany w transpozonie Tn551 na plazmidzie pI258) lub chromosomalnie (Tn 551) [89].

Makrolidy oraz linkozamidy są alternatywnym wyborem w leczeniu zakażeń gronkowcowych, gdy szczepy są odporne na penicylinę lub gdy pacjent jest uczulony na penicylinę, jeżeli nie występuje oporność *Staphylococcus aureus* na te leki. Oporność może być związana ze zmianami w RNA (metylacja miejsca wiązania antybiotyku na podjednostce 50S, co uniemożliwia wiązanie makrolidów i linkozamidów z rybosomem – oporność krzyżowa) [162].

Oporność na metycylinę (MRSA - Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) występuje głównie wśród szczepów izolowanych od chorych z zakażeniami szpitalnymi. Większość szczepów gronkowców opornych na metycylinę ma identyczny gen *mec A*, kodujący wytwarzanie białka PBP2a o niskim powinowactwie do wszystkich antybiotyków beta-laktamowych. Ten typ oporności ma istotne znaczenie kliniczne, gdyż żaden antybiotyk beta-laktamowy nie może być użyty w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy MRSA. Gronkowce odporne na metycylinę często są odporne na erytromycynę, klindamycynę i gentamycynę. Wysoką aktywnością wobec tych szczepów odznacza się wankomycyna i kotrimoksazol [31].

1.6.2.3. Aktywne usuwanie związku z komórki

Ważnym i szeroko rozpowszechnionym wśród drobnoustrojów mechanizmem oporności na różnego rodzaju związki (w tym chemioterapeutyki) jest czynne usuwanie ich z wnętrza komórki (pompa błonowa – „efflux mechanism”). Jest to spowodowane obecnością transporterów błonowych (białek) zależnych od energii pochodzącej z ATP lub z pompy protonowej (PMF – proton motive force). Wśród białek błonowych można wyróżnić kilka rodzin, które różnią się liczbą segmentów transmembranowych [84, 102].

Do białek zależnych od ATP należy rodzina transporterów wiążących ATP, tzw. transportery kasetonowe ABC, o charakterze P-glikoprotein [113]. Uczestniczą one w aktywnym usuwaniu licznych związków przeciwnowotworowych z komórek zmienionych, niektóre warunkują oporność na antybiotyki, np. u gronkowców oporność na makrolidy i streptograminy B [103].

Ważną rolę w oporności gronkowców na fluorochinolony odgrywa ich aktywne usuwanie z komórki. Odpowiedzialne za to jest białko *NorA*, zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej i będące produktem genu *norA* [69, 70]. Należy ono do rodziny MFS (Major Facilitator Superfamily) białek transportowych. Wykazano, że wzrost ilości białka *NorA* u gronkowców w rezultacie zwiększonej transkrypcji genu powoduje nie tylko oporność na fluorochinolony, ale obniża wrażliwość na różne strukturalnie związki jak cetrymid, bromek etydyny czy akryflawina [69, 128].

W przypadku tetracyklin jeden z mechanizmów oporności *Staphylococcus aureus* związany jest ze zmniejszeniem ich wewnątrzkomórkowego stężenia na skutek specyficznego mechanizmu usuwania [89]. Odpowiedzialne za nią jest białko *tetK* należące do rodziny MFS transporterów błonowych. Oporność indukcyjna na tetracykliny (z wyjątkiem półsyntetycznej minocykliny) kodowana jest przez małe plazmidy, natomiast oporność konstytutywna (na wszystkie tetracykliny) przez determinanty chromosomalne *tetM* i nie jest związana z pompą błonową tylko z aktywną ochroną rybosomu [42, 89].

1.7. *Staphylococcus aureus* a naturalne peptydy antybakteryjne

1.7.1. Czym są naturalne peptydy antybakteryjne?

Ludzki organizm wyposażony jest w szereg peptydów antybakteryjnych (powyżej 24), które są integralnym składnikiem odporności wrodzonej [44]. Produkowane są w dużych ilościach w miejscu infekcji i w warunkach stanu zapalnego. Ich szczególną właściwością jest szerokie spektrum antybakteryjne, niektóre z nich zaś wykazują aktywność przeciwwirusową, przeciwpasożytniczą i przeciwgrzybiczą [14]. Składają się z 12 – 50 aminokwasów wśród których dominują arginina, lizyna i histydyna. Posiadają ładunek dodatni od +2 do +7, co ma bardzo istotne znaczenie w oddziaływaniu z ujemnie naładowaną błoną komórkową bakterii. Ponad 50% ma właściwości hydrofobowe, co również odgrywa bardzo istotną rolę w interakcji z komórką bakteryjną. Ich rola w warunkach stanu zapalnego polega na inicjacji lizy komórek bakteryjnych i uwalnianiu bakteryjnych mediatorów stanu zapalnego (lipopolisacharydów i kwasu lipoteichojowego), degranulacji komórek tucznych (uwalniania histaminy i wazodylatacji) i stymulacji chemotaksji neutrofilów. Ponadto wpływają na hamowanie

fibrynolizy przez tkankowy aktywator plazminogenu, stymulują gojenie poprzez zwiększenie chemotaksji fibroblastów i ich wzrostu oraz hamują niszczenie tkanek przez inhibicję proteaz bakteryjnych [54].

Mają zdolność zabijania bakterii poprzez przenikanie i niszczenie ich błony komórkowej, a nie jak tradycyjne antybiotyki poprzez wiązanie się ze specyficzną strukturą komórkową. Brak konkretnego celu molekularnego w komórce bakteryjnej minimalizuje ryzyko rozwoju oporności, stąd też peptydy antybakteryjne stały się przedmiotem intensywnych badań laboratoryjnych w ostatnim dziesięcioleciu [14].

1.7.2. Właściwości wybranych peptydów antybakteryjnych

Spośród bardzo dużej liczby naturalnych peptydów antybakteryjnych (tab. 4.) do badań w prezentowanej pracy wybrano ludzką katelicydynę LL-37, ludzką beta – defensynę 3 (hBD3), laktoferryne i lizozym.

Jakkolwiek laktoferryne i lizozym są znane już od dawna to LL-37 i hBD3 są przedmiotem intensywnych badań od ok. 10 lat.

Laktoferryne jest proteiną wiążącą żelazo; wykazuje działanie bakteriobójcze w stosunku do bakterii G(+) i G(-) natomiast lizozym to termostabilna, kationowa muramidaza obecna w ludzkich neutrofilach, osoczu, łzach, wydzielinach błon śluzowych; aktywna w stosunku do drobnoustrojów G(+) [54, 119, 151].

W ludzkim organizmie katelicydyna hCAP18 jest przekształcana przez proteinazę 3 w aktywny peptyd LL-37 o strukturze alfa-helikальной, wykazujący właściwości bakteriobójcze w stosunku do drobnoustrojów Gram(+) i Gram(-) [133]. Peptyd ten został zbadany i opisany stosunkowo niedawno, bo w 1992 roku przez Zanetti i wsp. [161].

LL-37 jest obecny w neutrofilach [161], subpopulacjach limfocytów i monocytach [2]. Ponadto stwierdza się go w nasieniu [92], wydzielinie drzewa oskrzelowego [3, 9] i keratynocytach w warunkach stanu zapalnego [43].

Niezwykłe interesującym jest fakt, że wysoki poziom LL-37 stwierdzony w naskórku chorych na łuszczycę chroni ich przed infekcjami bakteryjnymi skóry, podczas gdy wyraźnie obniżony poziom tego białka u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry sprzyja częstym nadkażeniom bakteryjnym [43, 161]. Nosicielstwo *Staphylococcus aureus* stwierdzane u ponad 90% chorych z atopowym zapaleniem skóry wydaje się również mieć związek z obniżonym poziomem omawianego peptydu w naskórku.

Ludzka beta defensyna 3 (hBD3) została wyizolowana po raz pierwszy z łusek łuszczykowych. Reprezentuje grupę peptydów o strukturze β -kartki. Jest obecna w keratynocytach, neutrofilach i wszystkich nabłonkach. Wykazuje wysoką efektywność bakteriobójczą w stosunku do *Staphylococcus aureus* poprzez wiązanie się z ujemnie naładowaną ścianą komórkową bakterii, jej uszkodzenie powodujące wyciek zawartości oraz destrukcję na zasadzie osmolizy [60]. Podobnie jak w przypadku LL-37, ekspresja hBD3 u chorych z atopowym zapaleniem skóry jest obniżona, co prawdopodobnie przyczynia się do częstych infekcji bakteryjnych w tej grupie pacjentów [106].

Ekspresja LL-37 i hBD3 u chorych z nawracającą czyracczością nie była dotychczas badana, jednak powyższe obserwacje pozwalają wysunąć przypuszczenie, że może być ona obniżona.

Struktura omawianych powyżej peptydów jest dosyć dobrze poznana i obecnie trwają prace nad otrzymaniem ich syntetycznych prototypów w celu wprowadzenia na rynek farmaceutyczny.

Tab. 4. Charakterystyka peptydów i protein demonstrujących działanie antybakteryjne (AMP) występujących w skórze ssaków.

AMP obecne w komórkach organizmu	
Katelicyny	Frohm i wsp. (1997) Marchini i wsp. (2002)
β - defensyny	Harder i wsp. (2001) Liu i wsp. (2003)
BPI (bactericidal/permeability – increasing protein)	Takahashi i wsp. (2004)
Laktoferryina	Cumberbatch i wsp. (2000)
Lizozym	Marchini i wsp. (2002)
dermicydyna	Schittek i wsp. (2001) Murakami i wsp. (2004)
RNaza 7	Harder i Schroder (2002)

AMP obecne w komórkach nacieku zapalnego	
Katelicyny	Gallo i wsp. (1994) Marchini i wsp. (2002)
α - defensyny	Harwig i wsp. (1994)
Laktoferryina	Caccavo i wsp. (2002)
Granulizyna	Stenger i wsp. (1998)
Perforyna	Stenger i wsp. (1998)
eozynofilowa proteina kationowa/ RNaza 3	Domachowske i wsp. (1998a)
eozynofilowa neurotoksyna / RNaza 2	Domachowske i wsp. (1998b)

AMP obecne w komórkach nacieku zapalnego	
regulowane podczas aktywacji, normalne limfocyty T prezentowane i wydzielane (RANTES)	Tang i wsp. (2002)
czynnik płytkowy 4 (PF-4)	Tang i wsp. (2002)
peptyd 3 aktywujący tkankę łączną (CTAP-3)	Tang i wsp. (2002)
podstawowa proteina płytkowa	Tang i wsp. (2002)
tymozyna β -4 (T β -4)	Tang i wsp. (2002)
fibrynopeptyd B (FP - B)	Tang i wsp. (2002)
fibrynopeptyd A (FP - A)	Tang i wsp. (2002)

AMP zidentyfikowane jako inhibitory proteinaz	
hCAP18/LL-37 prosekwencja	Zaiou i wsp. (2003)
Antyleukoproteaza	Wingens i wsp. (1998)
elafina	Simpson i wsp. (1999) Meyer – Hoffert i wsp. (2003)
P – cystatyna α	Takahashi i wsp. (1994)
cystatyna C	Blankenvoorde i wsp. (1998)

AMP zidentyfikowane jako chemokiny	
Psoriazyna	Glaser i wsp. (2001)
monokina indukowana przez IFN- γ (MIG/CXCL9)	Cole i wsp. (2001 a)
proteina 10 kDa indukująca IFN- γ (IP-10/CXCL10)	Cole i wsp. (2001 a)
chemoatraktant limf. T indukujący IFN- γ (I – TAC/CXCL11)	Cole i wsp. (2001 a)

AMP zidentyfikowane jako neuropeptydy	
hormon stymulujący melanocyty α (α - MSH)	Cutuli i wsp. (2000)
substancja P	Kowalska i wsp. (2002)
Bradykinina	Kowalska i wsp. (2002)
Neurotensyna	Kowalska i wsp. (2002)
wazostatyna 1 i chromofungina (chromogranina A)	Tasiemski i wsp. (2002)
sekretolityna (chromogranina B)	Tasiemski i wsp. (2002)
proenkefalina A	Tasiemski i wsp. (2002)
Ubiquitina	Kieffer i wsp. (2003)
neuropeptyd Y	Lambert i wsp. (2002)
polipeptyd YY	Lambert i wsp. (2002)
Adrenomedullina	Allaker i wsp. (1999)

AMP zidentyfikowane na podstawie innych funkcji	
peptydy wywodzące się z hemoglobiny	Parish i wsp. (2001)
kalprotektyna (MRP8/MRP14)	Sohnle i wsp. (2000)

AMP zidentyfikowane na podstawie innych funkcji	
lipokalina związana z neutrofilową żelatynazą (NGAL)	Goetz i wsp. (2002)
epidermalny histon H1	Kashima i wsp. (1991)
Mieloperoksydaza	Rosen i Michel (1997)

2. Cele pracy

1. Identyfikacja fenotypowa szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową.
2. Zastosowanie technik biologii molekularnej (ADSRRS-fingerprinting, RAPD-PCR i PFGE) do analizy materiału genetycznego badanych szczepów *Staphylococcus aureus*.
3. Poszukiwanie nowych metod terapeutycznych alternatywnych dla konwencjonalnej antybiotykoterapii w czyraczności nawrotowej.

3. Materiały i metody

3.1. Izolaty *Staphylococcus aureus*

Kolekcja 81 szczepów *Staphylococcus aureus* została uzyskana od 48 chorych: 25 kobiet i 23 mężczyzn z czyracznością nawrotową i członków ich rodzin (8 osób) zgłaszających się do Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AMG oraz Zakładu Mikrobiologii Klinicznej SPSK1 w Gdańsku w okresie od 01.01.2001 do 31.12.2003 roku (w sumie 56 osób). W badanej grupie było 9 przypadków czyraczności rodzinnej (o czyraczności rodzinnej mówimy, gdy co najmniej 2 członków rodziny cierpi z powodu choroby). W dwóch rodzinach wykwity wystąpiły w tym samym czasie podczas gdy w pozostałych siedmiu choroba pojawiała się w różnych odstępach czasu u poszczególnych domowników. W badaniach wykorzystano szczep referencyjny *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Od wszystkich chorych pobierano wymazy z nosa, gardła oraz aspiraty z czyraków natomiast od członków ich rodzin wymazy z nosa i z gardła. Niestety nie udało się zbadać kolonizacji rodzinnej u ponad 50% chorych gdyż pacjenci nie wyrazili chęci stawienia się na badania. Grupę kontrolną stanowiło 30 studentów IV roku medycyny od których pobrano wymazy z nosa i z gardła.

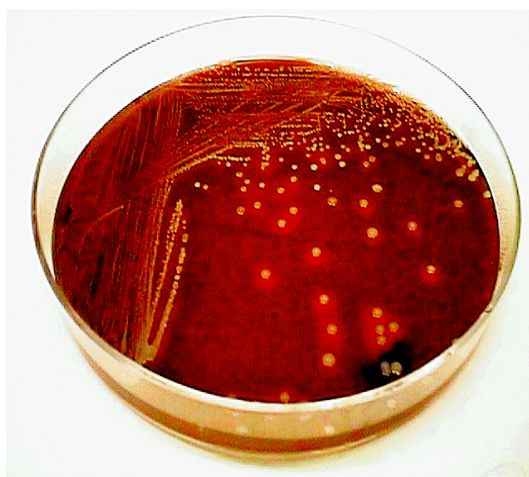
Wiek pacjentów: od 3 do 97 lat (średnia wieku 34 lata i 7 miesięcy), (tab. 5). Czas trwania choroby w badanej grupie wynosił od 4 miesięcy do 18 lat. U wszystkich pacjentów wykonano badania podstawowe: morfologię krwi z rozmazem, OB., transaminazy, poziom glukozy, mocznik, kreatyninę oraz badanie ogólne moczu.

Tab. 5. Czas trwania choroby w badanej grupie pacjentów.

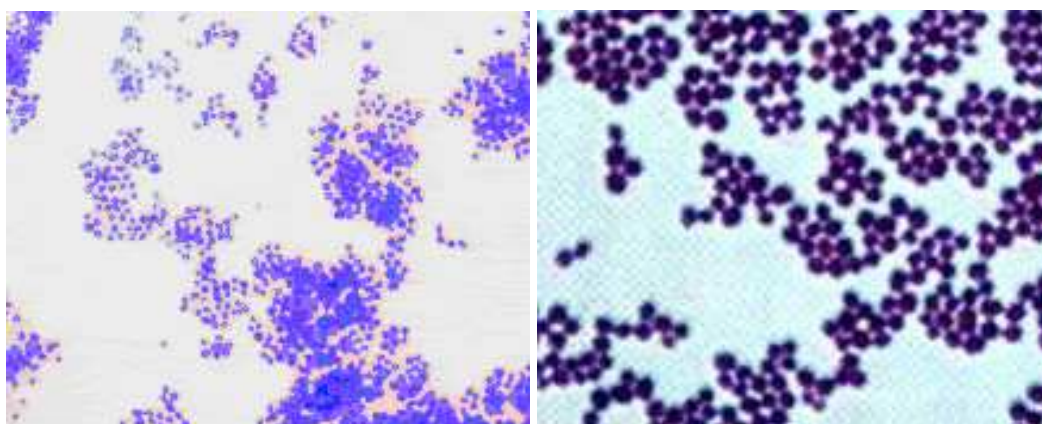
Czas trwania choroby	Liczba chorych
3 miesiące – 11 miesięcy	10
12 miesięcy – 3 lata	25
4 – 6 lat	9
> 7 lat	4

Identyfikacji *Staphylococcus aureus* dokonano na podstawie:

- morfologii kolonii i rodzaju hemolizy (ryc. 6)
- preparatu barwionego metodą Grama (ryc. 7 i 8)
- produkcji katalazy i koagulazy (ryc. 9)
- rozkładu mannitolu w warunkach tlenowych i beztlenowych



Ryc. 6. Kolonie *Staphylococcus aureus* na płycie krwawej Columbia.



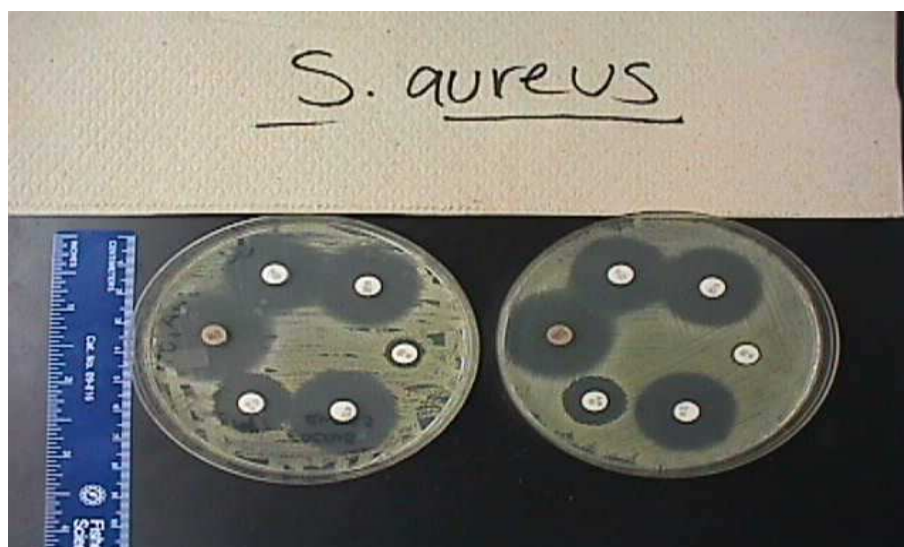
Ryc. 7 i 8. *Staphylococcus aureus* w barwieniu Grama, po lewej powiększenie 800×, po prawej 1600×.



Ryc. 9. Po lewej stronie szkiełka: kontrola ujemna. Po prawej stronie: rozkład nadtlenku wodoru w obecności gronkowca złocistego wytwarzającego katalazę – widoczne pęcherzyki gazu.

3.2. Określenie lekooporności badanych szczepów *Staphylococcus aureus*

Do badania lekooporności wybrano metodę dyfuzyjno - krążkową w agarze. Polega ona na rozproszaniu zawiesiny bakteryjnej w soli fizjologicznej o stężeniu 0.5 mF na pożywce Mullera – Hintona II w płytce Petriego i ułożeniu na niej krążków bibuły o średnicy 6 mm nasyconych antybiotykami. Antybiotyk dyfunduje promieniście do podłoża, tworząc gradient stężeń. Największa koncentracja antybiotyku występuje przy brzegach krążka i spada wraz z odległością. W ten sposób powstają strefy zahamowania wzrostu dla wysianej na podłożu zawiesiny drobnoustrojów. Miarą oporności badanego szczepu bakterii jest średnica strefy, na podstawie której charakteryzuje się drobnoustrój jako wrażliwy, średnio wrażliwy czy oporny (ryc. 10). Do oceny lekooporności badanych szczepów *Staphylococcus aureus* wybrano następujące antybiotyki: penicylinę, oksacylinę, doksycyklinę, erytromycynę, klindamycynę, chloramfenikol i ciprofloksacynę.

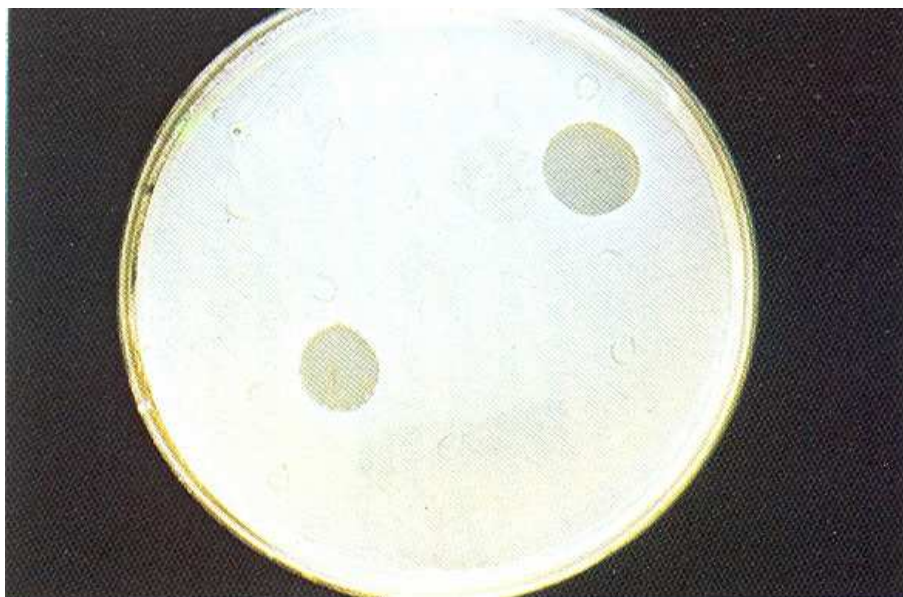


Ryc. 10. Antybiogram na podłożu Muller - Hintona II.

Po umieszczeniu krążków z antybiotykiem na agarze przechowywano płytki przez 30 min w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowano w cieplarni w 37°C przez 18 godzin. Następnie dokonywano pomiaru strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków (w mm).

3.3. Typowanie bakteriofagowe szczepów *Staphylococcus aureus*

Bakteriofagi są to wirusy bakteryjne, które zakażają wrażliwe bakterie i powodują ich śmierć. Bakteriofagi podzielono na dwie duże grupy: fagi zjadliwe, powodujące zawsze lizę zakażonej komórki z równoczesnym wydostawaniem się do otaczającego środowiska nowych cząsteczek fagowych, oraz fagi łagodne, które po wnikięciu do wrażliwej komórki bakteryjnej nie namnażają się. Kwas dezoksyrybonukleinowy faga zaczepia się na chromosomie bakterii. Proces reduplikacji cząsteczek faga jest zahamowany. Zjawisko przyjęcia i zaczepienia się kwasu nukleinowego faga w komórce bakteryjnej nazywa się lizogenią, czyli zdolnością komórki do rozpuszczenia się po zadziałaniu czynników, np. promieni nadfioletowych odblokowujących syntezę faga.



Ryc. 11. Przykład typowania fagowego.

Metoda ta jest cennym narzędziem w badaniach epidemiologicznych. Na powierzchnię podłoża, na które jednolicie rozprowadzono uprzednio przygotowaną hodowlę określonego szczepu gronkowca, posiewa się po 1 kropli zawiesiny zawierającej odpowiedniego faga typującego. W celu wytypowania szczepu wysiewa się go podobnie jak w przypadku antybiogramów na pożywkę stałą, a następnie nakrapla się różne bakteriofagi. W miejscach, w których bakterie zostały zaatakowane przez fagi powstaje liza. Według schematu lizy gronkowce można podzielić na grupy fagowe.

3.4. Metody biologii molekularnej zastosowane w analizie szczepów *Staphylococcus aureus*

3.4.1. Izolacja genomowego DNA i technika ADSRRS-fingerprinting

DNA:

Genomowe DNA *Staphylococcus aureus* pozyskano na drodze izolacji zgodnie z procedurą załączaną do zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska).

Materiały:

- hodowle bakteryjne-szczepy kliniczne *Staphylococcus aureus*
- bufor lizujący LT
- bufor płuczający
- roztwór proteinazy K
- lizostafyna
- lizozym
- bufor Tris (10 mM, pH=8.0)

Aparatura, drobny sprzęt laboratoryjny:

- wirówka
- pipety automatyczne
- cieplarka 37°C
- termoblok 75°C
- próbówki eppendorfa
- tipsy
- kolumny ze złożem krzemionkowym
- worteks

Procedura wykonania (na podstawie protokołu Genomic Mini A&A Biotechnology):

- Zebrać szczepy bakteryjne z płytki za pomocą jałowego tipsa i zawiesić w 100 µL 10 mM Tris-HCl
- Dodać 20 µL lizostafyny oraz lizozym na końcówce tipsa. Wymieszać całość i inkubować 60 minut w temperaturze 37°C
- Dodać 200 µL uniwersalnego buforu lizującego LT oraz 20 µL Proteinazy K
- Przenieść próbkę do 75°C – termobloku i inkubować przez 5 min.

- Intensywnie worteksować próbkę przez 20 sekund i wirować przez 3 min. przy 10-12 RPM.
- Pobrać supernatant i nanieść na mikrokolumnę do oczyszczania genomowego DNA. Wirować przez 1 min. przy 10-12 tys. RPM.
- Wyjąć mikrokolumny wraz z próbkami i dodać do kolumny 500 μ L buforu płuczącego. Wirować przez 1 min. przy 10-12 RPM.
- Przenieść mikrokolumny do nowej probówki 1.5 ml i dodać 300 μ L buforu lizującego. Wirować przez 2 min. przy 10-12 tys. RPM.
- Umieścić osuszoną mikrokolumnę w nowej probówce 1.5 ml i dodanie do złoża znajdującego się na dnie kolumny 100 μ L buforu elucyjnego (10 mM Tris-HCl) ogrzanego w termobloku do temp. 75°C.
- Inkubować próbki przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Wirować przez 1 min. przy 10-12 tys. RPM. Usunąć kolumny i pozostawić oczyszczone DNA znajdujące się w probówce do dalszych analiz.

Zasada izolacji

Zaproponowana procedura izolacji genomowego DNA opiera się na zdolnościach DNA do wiązania się do specjalnie spreparowanych złóż krzemionkowych. DNA przechodząc przez złożę osiada na nim, w przeciwieństwie do zanieczyszczeń materiału genetycznego, które są niezwiązywalne ze złożem. Wiązanie DNA następuje w wysokich stężeniach soli chaotropowych.

Sole chaotropowe obok detergentów niejonowych wchodzi w skład buforu lizującego LT.

Dodatkowo lizę komórek wspomaga enzym o właściwościach proteolitycznych-proteinaza K, który powoduje degradację wszystkich białek ekspresowanych przez komórkę bakterii.

3.4.1.1. Elektroforeza agarozowa

Elektroforeza w żelu agarozowym jest techniką służącą do rozdzielania, identyfikacji oraz oczyszczania dużych fragmentów DNA. Rozdział cząsteczek w żelu zachodzi pod wpływem przepływu prądu elektrycznego i polega na różnicach w migracji biocząsteczek różniących się masą cząsteczkową.

W celu wizualizacji wyników (do barwienia prążków DNA w żelu) używamy roztworu bromku etydyny o stężeniu 5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ dodawanego przed wylaniem żelu na płytkę.

Bromek etydyny jest związkiem interkalującym pomiędzy pary zasad w kwasie nukleinowym, a jego właściwości fluorescencyjne pozwalają na wykrycie nawet kilkudziesięciu ng DNA w żelu, przy użyciu lampy UV.

Uwaga! Bromek etydyny jest silnym mutagenem. Należy stosować rękawiczki gumowe i unikać bezpośredniego kontaktu związku ze skórą.

W celu sprawdzenia efektywności izolacji genomowego DNA bakterii produkty izolacji rozdzielamy metodą elektroforezy agarozowej. Stosujemy 1% żel agarozowy, a elektroforezę prowadzimy zgodnie z przedstawioną procedurą.

Materialy:

- materiał genetyczny – genomowe DNA *Staphylococcus aureus*
- agaroz (Sigma, USA)
- bufor do elektroforezy 1 $\times$ TAE (przygotowano na bazie roztworu 50 $\times$ TAE)
- roztwór bromku etydyny (5 $\mu\text{L}/\text{ml}$)
- bufor do nanoszenia próbek (40% roztwór sacharozy w wodzie, 0.25% roztwór błękitu bromofenolowego)
- rękawiczki lateksowe

Aparatura:

- zestaw do elektroforezy agarozowej (aparat, tacka, grzebień, zasilacz)
- transiluminator
- kuchenka mikrofalowa

Procedura wykonania:

- Przygotować 1% żel agarozowy w buforze 1 $\times$ TAE. Agarozę rozpuszczono w kuchenie mikrofalowej doprowadzając do początku wrzenia.
- Ostudzić żel do temp.30°C, dodać bromku etydyny, wylać żel na płytkę, wstawić grzebień.
- Po czasie około 20 minut(czas na zastygnięcie żelu) wyjąć grzebień; wstawić żel do aparatu do elektroforezy.
- Napełnić aparat buforem 1 $\times$ TAE do wysokości 5mm nad powierzchnią żelu

- Do próbek DNA dodać buforu do nanoszenia, mieszać, umieścić za pomocą pipety automatycznej w studzienkach żelu.
- Włączyć zasilanie ze stabilizatora prądu do aparatu do elektroforezy (60V).
- Elektroforezę zakończyć wyłączając zasilanie, gdy barwnik osiągnie przeciwny koniec żelu, podświetlić żel lampą UV i obserwować powstałe prążki DNA.

3.4.1.2. Trawienie restrykcyjne genomowego DNA

Materiały:

- materiał genetyczny- DNA genomowe *Staphylococcus aureus*
- Bufor SH do trawienia (SIGMA)
- endonukleaza *Xba* I (SIGMA)
- endonukleaza *Bam* HI (SIGMA)

Aparatura i sprzęt laboratoryjny:

- Pipety automatyczne
- Tipsy
- Próbówki eppendorfa
- Ciepłarka 37°C

Uwagi do reakcji trawienia

Bufor SH jest rekomendowanym przez firmę SIGMA buforem do trawienia DNA przy użyciu restryktazy *Xba*I.

Skład buforu SH:

- 50mM Tris-HCl
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 1mM ditiotritol
- pH 7.5

Bufor SH stwarza dobre warunki buforowe dla trawienia restryktazą *Bam*HI. SIGMA gwarantuje 50% wydajność trawienia. Dzięki temu trawienie enzymami *Bam*HI i *Xba*I można przeprowadzić jednocześnie, unikając konieczności przygotowywania osobnych reakcji trawienia i etapu precypitacji po trawieniu pierwszą z restryktaz.

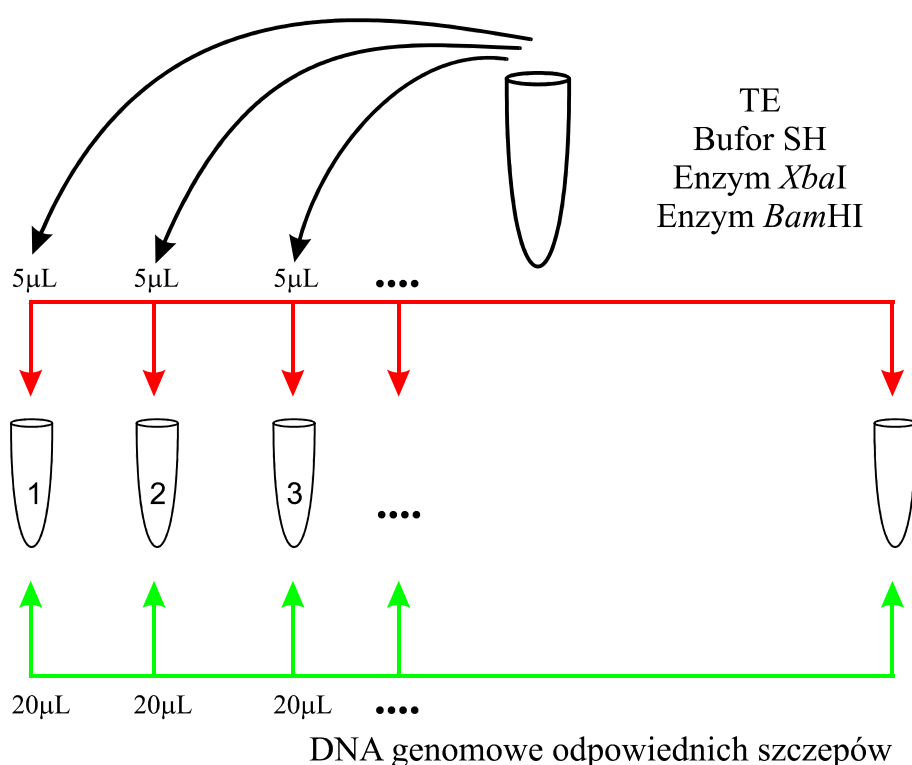
Procedura:

W probówce eppendorfa przygotowujemy mieszaninę odczynników do reakcji trawienia o poniższym składzie:

Odczynnik	Ilość na 1 próbę trawienia [μL]
TE	2
Bufor SH	2
Enzym <i>Xba</i> I	0.5
Enzym <i>Bam</i> HI	0.5
Przygotowujemy mastermix proporcjonalnie do ilości próbek DNA	

Z przygotowanej mieszaniny pobieramy pipetą po 5 μL mieszaniny i przenosimy do nowych próbek eppendorfa, oznaczonych kolejno numerami szczepów. Do każdej z nich dodajemy po 20 μL genomowego DNA *Staphylococcus aureus*.

Trawienie prowadzimy przez 2 godziny w temperaturze 37°C w objętości końcowej 25 μL /próbę.



Ryc. 12. Reakcja trawienia DNA

W wyniku zastosowania trawienia enzymami *Xba* I i *Bam*HI uzyskujemy trojaki rodzaj produkty. Enzym *Xba*I o sekwencji rozpoznania



jest enzymem rzadko tnącym (RT).

Enzym *Bam HI* jest szóstkowym enzymem często tnącym (CT) w obrębie genomu *Staphylococcus aureus*. Ma on następującą sekwencję rozpoznania:



W wyniku trawienia tymi enzymami powstają produkty o różnych długościach i zróżnicowanych lepkich końcach.

3.4.1.3. Precypitacja po trawieniu

Materialy:

- Produkty trawienia enzymatycznego genomowego DNA *Staphylococcus aureus* restryktazami *XbaI* i *BamHI*
- Etanol 96%
- Etanol 70%
- Glikogen
- 3M octan sodu
- Woda jałowa

Aparatura, sprzęt laboratoryjny

- pipety automatyczne
- zamrażarka
- tipsy
- wirówka

Przebieg precypitacji

Po zakończeniu reakcji trawienia restrykcyjnego uzupełniamy próbkę 175 µL TE. Kolejno produkty reakcji poddajemy reakcji precypitacji, w celu zagęszczenia potrawionego DNA w próbce.

W tym celu do każdej próbki z produktami trawienia dodajemy 2 µL glikogenu-wzmacniacza precypitacji, 1/10 objętości próbki wyjściowej 3M roztworu octanu sodu-20µL, oraz 96% alkohol etylowy w objętości równej 2 objętością próbki do precypitacji- czyli 400 µL. Po wymieszaniu próbek, w celu stworzenia jednorodnej mieszaniny do precypitacji, wkładamy je do zamrażalnika o temp. -20°C 2 godziny.

Następnie próbówki wirujemy przez 15 minut przy 12 tys. RPM. Zlewamy supernatant i osad przemywamy 300 μ L 70% etanolu. Wirujemy próbki kolejne 10 minut przy obrotach 12 tys. RPM.

Po wirowaniu zlewamy supernatant i osad suszymy w temp. pokojowej.

Po wysuszeniu, osad zawieszamy w 20 μ L wody jałowej- otrzymując w ten sposób próbki przygotowane do reakcji ligacji z adaptorami.

Uwagi do precypitacji:

Precypitację prowadzimy przez 2 h w temp -20°C , możemy je także precypitywać w zamrażarce przez całą noc, lub tylko 10 minut umieszczając próbówki w suchym lodzie.

3.4.1.4. Reakcja ligacji

Materiały:

Sprecypitowane produkty trawienia enzymatycznego genomowego DNA *Staphylococcus aureus* restryktazami *Xba*I i *Bam*HI

Oligonukleotydy:

- *Xba* I pomshort
- bisshort
- *Bam*HIpomlong
- primerlong
- Ligaza faga T4 (firmy Fermentas)
- Bufor do ligazy (firmy Fermentas)

Aparatura:

- Wirówka
- Pipety automatyczne
- Cieplarka 37°C
- Termoblok 90°C

Przygotowanie adaptorów do reakcji ligacji

Adaptory short i long do reakcji ligacji przygotowaliśmy hybrydując ze sobą odpowiednie oligonukleotydy według poniższej tabeli:

ENZYM RESTRYK- -CYJNY	OLIGONUKLEOTYD POMOCNICZY		OLIGONUKLEOTYD LIGOWANY		ADAPTOR
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa
Xba I	<i>XbaI</i> pomshort	5`CTAGGTCGACGTT	bisshort	5`CCTTCATCCACCAACGTCGAC	short
BamHI	<i>Bam</i> HIpomlong	5`GATCCGTCGACCACGTT TCCTTCCTGTCTACCATCC	liglong	5`GGATGGTAGACGAAGGAACGCC GTTGTCGACG	long

Hybrydyzacja oligonukleotydów do postaci adaptora jest możliwa dzięki ich specjalnie zaprojektowanej sekwencji.

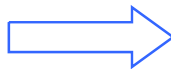
W skład każdego z adaptorów wchodzi oligonukleotyd pomocniczy (pomlong lub pomshort), który w etapie ligacji do trawionego DNA genomowego, pomaga na wiązanie się właściwego oligonukleotydu, tzw. oligonukleotydu ligowanego (bisshort lub liglong) lepkich końców pozostawionych po trawieniu restryktazami na matrycy.

Dzięki komplementarności oligonukleotydów zawsze pomlong hybrydyzuje z liglong, a pomshort z bisshort.

Otrzymanie adaptorów polega na sporządzeniu równomolowych mieszanin odpowiednich oligonukleotydów w wodzie. Mieszaniny takie inkubuje się w 90°C przez 1 minutą, a następnie chłodzi przez kolejne 10 minut w temperaturze pokojowej.

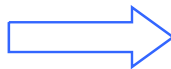
W naszym doświadczeniu przygotowujemy po 50 µL adaptora short i long mieszając odpowiednio:

5µL oligonukleotydu *XbaI*pomshort
5µL oligonukleotydu *bisshort*
40µL wody



short adaptor

5µL oligonukleotydu *liglong*
5µL oligonukleotydu *BamHI*pomlong
40µL wody



long adaptor

Ryc. 13. Reakcja otrzymywania adaptorów

Reakcja ligacji

Reakcję ligacji prowadzimy w probówkach eppendorfa zawieszając osad po precypitacji w objętości 20 µL sporządzonego mastermixu do ligacji.

składnik	Ilość na 1 próbę ligacji [µL]
Woda	13
bufor do ligazy	2
Adaptor long	2
Adaptor short	2
Ligaza	1

Ligację prowadzimy w temperaturze pokojowej, tj. około 20° C, przez 1.5 h.

3.4.1.5. Precypitacja po ligacji

Materiały

- Izopropanol
- 3M octan sodu
- Etanol 70%
- Bufor TE
- Produkty ligacji trawionego DNA z adaptorami

Aparatura:

- Pipety automatyczne
- Wirówka

Przebieg precypitacji:

Do probówek z mieszaniną ligacyjną dodajemy bufor TE rozcieńczając próbę do objętości 100 µL. Precypitację prowadzimy z zastosowaniem równej objętości

alkoholu izopropylowego i obecności wzmacniacza precypitacji-3M octanu sodu w ilości 1/10 próby. Próbkę inkubujemy w temperaturze pokojowej przez 10 min. Następnie próbkę wirujemy przez 10 minut przy 12 tys. RPM. Zlewamy supernatant i osad przemywamy 200 μ L 70% etanolu. Wirujemy próbki kolejne 10 minut przy obrotach 12 tys. RPM. Osad suszymy w temp. pokojowej następnie rozpuszczamy w TE (20 μ L).

3.4.1.6. Reakcja PCR

Aparatura

- Termocykler(Perkin- Elmer GENEMAMP®PCR SYSTEM 2004)
- Cienkościenne probówki do PCR (0.1 ml)
- Pipety automatyczne
- Tipsy
- Worteks

Materiały i wykonanie mastermixu

Próby do reakcji PCR przygotowujemy w specjalnych probówkach do których rozporcjowujemy mastermix, przygotowany w następujących proporcjach:

Składnik	Ilość [μ L] na 1 próbę
Mieszanina ligacyjna	4
Woda do reakcji PCR	32.8
Bufor do reakcji PCR	5
dNTPs	5
Polimeraza DNAtermo-stabilna	0.3
MgCl ₂	2
Starter bissshort	0.5
Starter primelong	0.5

Do każdej probówki przenosimy po 46 μ L mieszaniny reakcyjnej i dodajemy po 4 μ L odpowiedniej mieszaniny ligacyjnej.

Reakcję PCR przeprowadzamy zatem w objętości próby 50 μ L, w termocyklerze, zgodnie z następującym profilem termicznym:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
94	300	prePCR
72	300	
94	300	

Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
94	30	20 cykli
60	30	
72	90	
72	420	
4	∞	

W reakcji używamy starterów o stężeniu 100 µL i następujących sekwencjach:

Bisshort 5` CCTTCATCCACCAACGTCGAC
Primelong 5` GGATGGTAGACGAAGGAACGC

3.4.1.7. Elektroforeza poliakrylamidowa

W celu rozdzielania produktów reakcji PCR stosujemy technikę elektroforezy poliakrylamidowej.

Jest to metoda do rozdziału i analizy małych fragmentów DNA, o wielkości do 1000 pz.

Żel poliakrylamidowy powstaje przez polimeryzację monomerów akrylamidowych w długie łańcuchy. Są one następnie kowalencyjnie związane przez N,N'-metyleno-bisakrylamid. Polimeryzacja żelu inicjowana jest przez wolne rodniki, dostarczane przez nadsiarczan amonu i stabilizowane przez TEMED.

Wielkość por w żelu zależy od zawartości akrylamidów. Zwiększenie procentowości w żelu pociąga za sobą zmniejszenie por. Dlatego należy dobrać odpowiednią procentowość żelu dla rozdziału fragmentów o przewidywanej wielkości.

W przypadku naszej procedury zastosowaliśmy elektroforezę poliakrylamidową w żelu 6%.

Do przygotowania 40 ml żelu użyliśmy:

- 28 ml wody
- 8 ml 30% roztworu akrylamidów
- 4 ml Buforu 10 ×TBE
- 300 µL 10% nadsiarczanu amonu
- 30 µL TEMED-u

Elektroforezę prowadziliśmy w aparacie Hoefera, przy napięciu 170 V i w czasie 3h. Po zakończeniu rozdziału, żel barwiliśmy w kąpeli barwiącej – woda z dodatkiem bromku etydyny, w celu wizualizacji wyników.

Wyniki rozdziału produktów PCR obserwowaliśmy na transiluminatorze, pod światłem UV.

3.4.1.8. ODCZYNNIKI - skład buforów i roztworów

Zestaw do izolacji genomowego DNA

- Proteinaza K (20 mg/ml)
- Roztwór LT
- Bufor płuczący
- Bufor TE (na 50 ml - 0.5 ml 0.1 M roztworu Tris: 0.1 ml 0.5 M roztworu EDTA)

Odczynniki do trawienia restrykcyjnego

- SH bufor (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DDT, pH=7.5)
- Enzym restrykcyjny XbaI
- Enzym restrykcyjny Bam HI
- Roztwór TE

Odczynniki do ligacji

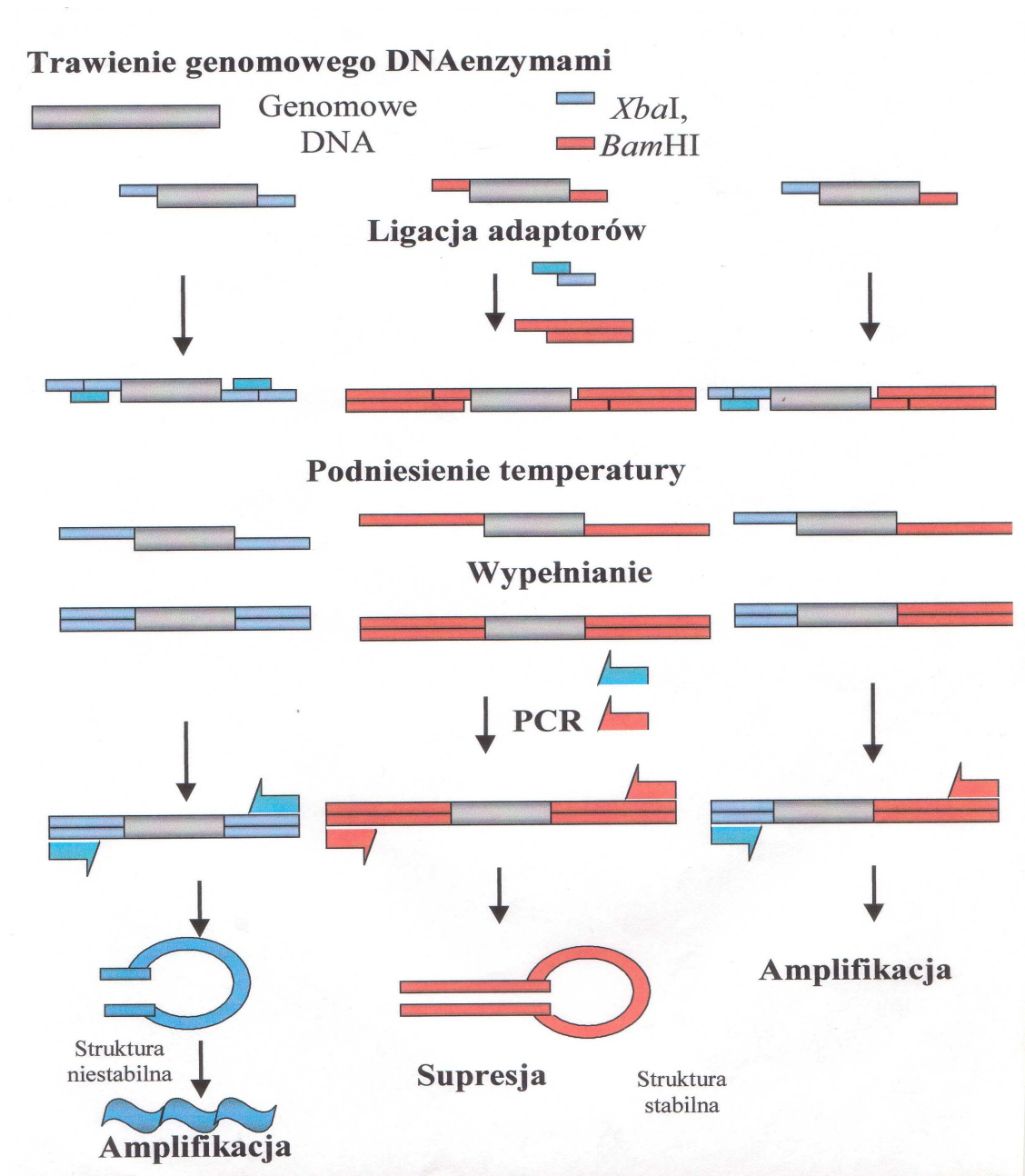
- T4 DNA Ligaza (Fermentas) 5u/μL
- 10 × bufor do ligacji (Fermentas) (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH=7.8)

Odczynniki do reakcji PCR

- Bufor do reakcji PCR 10 × stężony (100 mM Tris-HCl pH=8.0 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 20 mM MgCl₂)
- Deoksynukleotydy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP po 2.5 mM)
- Polimeraza Pwo
- Startery

Odczynniki do elektroforezy poliakrylamidowej

- Bufor 10 × TBE (na 500 ml: Kwas borowy - 27.5 g; EDTA - 4.65g; Tris - 54 g)
- Roztwór bromku etydyny w wodzie (stężenie 5 μL/ml)
- 30% roztwór akrylamidowy (akrylamidy 29%: bis-akrylamidy 1%)
- nadsiarczan amonu
- TEMED



Ryc. 14. Technika ADSRRS-fingerprinting.

3.4.2. Technika RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)

Metodą tą otrzymujemy wzór „odcisku palca” dzięki dowolnie wybranym starterom, które przyłączają się losowo do jednoniciowej matrycy DNA. To losowe przyłączanie i amplifikacja umożliwia wykrycie polimorfizmu genetycznego mikroorganizmów. Wykrywanie produktów PCR odbywa się na drodze elektroforezy w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Analizę zdjęć żeli elektroforetycznych

możemy wykonać wizualnie albo cyfrowo, za pomocą specjalistycznego oprogramowania, w zależności od liczby produktów PCR. Powtarzalność wyników RAPD-PCR jest trudna do osiągnięcia, ale nie niemożliwa. Konieczna jest standaryzacja postępowania na każdym etapie, tj. stosowanie tej samej metody izolacji DNA, używanie podobnej ilości badanego DNA w PCR, zastosowanie takich samych partii odczynników, polimerazy DNA i takiego samego termocyklera. Dzięki temu osiągamy zadawalającą powtarzalność w obrębie jednego laboratorium. Powtarzalność międzylaboratoryjna tej metody nie jest praktycznie możliwa [97].

Amplifikację przeprowadzono z 1 μ L DNA w końcowej objętości 25 μ L. Mieszanina reakcyjna zawierała 2.5 μ L buforu reakcyjnego (Finnzymes Inc., Espoo, Finland), 1.5 μ L dNTP, 1 μ L startera 5'- AAG AGC CCGT – 3' (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech) i 19 μ L wody. Zastosowano 0.4 μ L polimerazy DNA DyNAzyme II (Finnzymes) z *Thermus brockianus*. Ustalono następujący profil termiczny – czasowy reakcji: 2 min w 94°C, 5 cykli – 30s w 94°C, 5 min w 30°C, 1 min w 72°C, a dalej 25 cykli – 30s w 94°C, 1 min w 30°C, 1 min w 72°C. Amplifikację kończy ostatni cykl trwający 5 min w 72°C. Używano termocyklera Biometra T1. Produkty PCR rozdzielono elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym (1 g z 99 ml 1×TBE) (10×TBE – pH 8.0 – 10.8 Tris, 5.5g kwasu borowego, 4 ml 0.5M EDTA, pH 8.0), barwiono bromkiem etydy i fotografowano stosując transiluminator UV. Jeśli badane izolaty miały jednakowe wzory elektroforetyczne zamplifikowanego DNA uznawano je za należące do tego samego klonu. Gdy występowały niewielkie różnice (2-3 prążki) uważano izolaty za spokrewnione. W celu standaryzacji wszystkie reakcje RAPD – PCR przeprowadzono w jednym termocyklerze, posługując się tą samą partią polimerazy DNA i odczynników. Przeprowadzono jednocześnie PCR dla kilkudziesięciu izolatów, by móc porównać wzory elektroforetyczne uzyskane w tym samym czasie. Dzięki temu, że większość izolatów została przebadana kilkakrotnie i w różnych odstępach czasowych, uzyskano pewność co do powtarzalności otrzymanego typowania. W porównaniu z RAPD – PCR technika ADSRRS-fingerprinting charakteryzuje się znacznie większą powtarzalnością wyników i większą siłą różnicującą.

3.4.3. Elektroforeza pulsacyjna fragmentów restrykcyjnych – PFGE

Metodą referencyjną w większości dochodzeń epidemiologicznych jest PFGE, polegająca na rozdzielaniu w zmiennym polu elektrycznym dużych fragmentów DNA uzyskanych dzięki trawieniu chromosomu bakteryjnego rzadko tnącymi enzymami restrykcyjnymi. Zaletami tej metody jest wysoka powtarzalność i dobry potencjał różnicujący, a wadami drogi sprzęt, duży stopień skomplikowania i czas trwania nawet do 7 dni. Izolacja DNA i trawienie restryktazami odbywa się w bloczkach agarozowych co zabezpiecza chromosom bakteryjny przed fragmentacją. Technikę tę zastosowano do typowania szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyraczną rodzinną w celu potwierdzenia wyników otrzymanych technikami ADSRRS-fingerprinting i RAPD-PCR.

Pojedynczą kolonię przenoszono do bulionu LB i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C. Komórki wirowano i zawieszano w buforze TE [136]. Do takiej zawiesiny dodawano buforu EC (6 mM Tris-HCl, 1 M NaCl 100 mM EDTA, 0.5% Brij 58, 0.2% deoksycholan sodu, 0.5% sarkozyl) i płynnej agarozы o obniżonej temperaturze topnienia w celu otrzymania bloczków agarozowych. Bloczki umieszczano w buforze lizującym (bufor EC z 10 mg/ml RNazyA i lizozymem - 12500 µg/50 ml) i inkubowano przez 16 h, w 37°C. Następnie bloczki agarozowe inkubowano w roztworze proteinazy K (20 mg/ml) przez noc, w 50°C. Następnego dnia bloczki oczyszczano w buforze płuczącym TE, cztery razy po 60 min. Trawienie enzymem restrykcyjnym *XbaI* (SIGMA), w ilości 25u (170 µL H₂O, 30 µL buforu Yellow Tango i 2 µL enzymu), przeprowadzano przez noc w 37°C w łaźni wodnej. Bloczki następnie umieszczano na grzebieniu do elektroforezy i przyklejano agarozą o obniżonej temperaturze topnienia. Tak przymocowane bloczki, razem z grzebieniem, zalewano agarozą by otrzymać właściwy żel. Fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie, stosując zmienne pole elektryczne (pulsacyjne) w aparacie CHEF DRII (BioRad, CA, USA), w 1% żelu agarozowym, przy napięciu 6V/cm i pulsie 1 do 30s przez 28h. Wyniki analizowano wizualnie wg kryteriów Tenover po barwieniu DNA bromkiem etydyny [146].

3.5. Oznaczanie wrażliwości szczepów *Staphylococcus aureus* w stosunku do naturalnych peptydów antybakteryjnych

3.5.1. Peptydy

Kationowy peptyd LL-37 o sekwencji aminokwasów LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES (MW 4492) został zsyntetyzowany przez Innovagen AB (Lund, Szwecja). Czystość i masa molekularna peptydu została potwierdzona przez analizę spektralną (MALDI.TOF Voyager). Lizozym uzyskany z białka jaja kurzego i laktoferryne wyizolowana z mleka ludzkiego zostały dostarczone przez firmę Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Ludzka beta defensyna 3 (hBD-3) została zsyntetyzowana przez PeproTech Inc (USA).

3.5.2. Technika radiodyfuzji

Jedna kolonia bakteryjna pobrana z krwawej płytki agarowej została umieszczona w bulionie sojowym (10 ml, TSB) i inkubowana przez 18 godzin w cieplarni w 37°C, 5% CO₂.

Technika radiodyfuzji została przeprowadzona zgodnie z zasadami podanymi przez Lehrera i wsp. [82]. Szczepy *Staphylococcus aureus* były inkubowane do uzyskania środkowej fazy wzrostu logarytmicznego w 10 ml w 3% TSB (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD). Mikroorganizmy były raz płukane w 10 mM Tris, pH 7.4. 4×10⁶ jednostek bakteryjnych tworzących kolonie (cfu – colony forming units) dodawano do 5 ml żelowego podłoża agarozowego, składającego się z 0.03% TSB, 1% nisko-elektroosmotycznej (Low-EEO) agarozy (Sigma, St Louis MO) i 0.02% Tween 20 (Sigma). Podłoże to było wylewane do płytek petriego Ø 85 mm. Po zastygnięciu agarozy wykonano 4 mm średnicy rynienki przy pomocy urządzenia do biopsji skórnych i наносzono do nich 6 µL badanego peptydu (laktoferryne, lizozymu i LL-37 w stężeniu 50 i 100 µM), kombinacji peptyd – peptyd (użyto wówczas mieszaniny złożonej 3 µL lizozymu i 3 µL LL-37 w stężeniu 50 i 100 µM), antybiotyków: erytromycyny, doksycykliny i klindamycyny (w stężeniu 50 i 100 µM) oraz kombinacji peptyd – antybiotyk (używając mieszaniny 3 µL antybiotyku i 3 µL LL-37 w stężeniu 50 i 100 µM). Płytki inkubowano w 37°C przez 3 godziny aby

umożliwić dyfuzję peptydów, antybiotyków i badanych kombinacji peptyd-peptyd i peptyd- antybiotyk. Następnie na płytki z badanymi substancjami wylewano żel składający się z 6% TSB i 1.0% nisko-elektroendoosmotycznej (Low-EEO) agarozы (Sigma, St Louis MO) rozpuszczonych w wodzie destylowanej. Aktywność antibakteryjną badanej substancji oceniano jako strefę zahamowania podłoże wzrostu wokół każdej z rynienek po 18-24 godzinach inkubacji w 37°C.

3.5.3. Metoda jednostek tworzących kolonie (CFU- Colony Forming Units)

Szczepy *Staphylococcus aureus* były inkubowane do uzyskania środkowej fazy wzrostu logarytmicznego w bulionie Todd-Hewitt (TH) (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD). Bakterie były płukane i rozcieńczone w 10 M Tris pH 7.4 zawierającym 5 mM glukozę. Następnie *Staphylococcus aureus* (50 μ L; 2×10^6 bakterii w ml) był inkubowany w 37°C przez 2 godziny z lizozymem, LL-37 jak również kombinacją obu peptydów w stężeniach od 0.03 to 60 μ M. W celu ilościowego określenia aktywności bakteriobójczej badanych substancji, seryjne rozcieńczenia inkubowanej mieszaniny były wysiewane na płytki petriego z agarem Todd-Hewitt (TH) (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD), następnie inkubowane w 37°C przez 18 godzin, po czym liczona była liczba jednostek tworzących kolonie (cfu). O aktywności bakteriobójczej badanej substancji bądź mieszaniny substancji świadczył brak kolonii bakteryjnych na płytce.

3.5.4. Metoda jednostek tworzących kolonie dla oceny aktywności przeciwbakteryjnej hBD3

W przypadku badania właściwości bakteriobójczych hBD3 w stosunku do *Staphylococcus aureus* powyższa metoda została nieco zmodyfikowana ze względu na hamujące właściwości niektórych podłoży i buforów w stosunku do badanego peptydu. Szczepy *Staphylococcus aureus* były inkubowane do uzyskania środkowej fazy wzrostu logarytmicznego w bulionie Todd-Hewitt (TH, Becton-Dickinson, Cockeysville, MD). Bakterie były płukane i rozcieńczone w 10 mM buforze – fosforanie sodu o pH 7.4. Następnie w ilości 2×10^6 bakterii/ml inkubowane w 37°C z hBD3 (w stężeniach 0.25-10 μ g/ml) przez 3 godziny (3 μ L zawiesiny bakteryjnej i 12 μ L peptydu

w odpowiednim stężeniu). Pozostałe etapy były analogiczne jak w metodzie opisanej powyżej.

3.5.5. Technika frakcjonowanych stężeń hamujących

W celu oceny aktywności przeciwbakteryjnej kombinacji LL-37 z lizozymem i erytromycyną zastosowano metodę szachownicy [63]. Użyto następujących stężeń badanych substancji (w mg/L): LL-37: 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0; lizozym: 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128.0 i erytromycyna: 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0. Peptydy zostały rozcieńczone w 0.01% kwasie octowym zawierającym 0.2% wołowej albuminy. Erytromycyna została rozpuszczona w wodzie destylowanej. Użyto płytek zawierających 96 rynienek o pojemności 200 μ L każda. Badane substancje nanoszono w następujący sposób: 50 μ L badanej substancji antybakteryjnej A (nanoszonej wzdłuż szeregów), 50 μ L substancji antybakteryjnej B (nanoszonej wzdłuż kolumn) i 10 μ L inokulum rozpuszczonego w MHB (bulione Muller – Hinton) (4.6×10^6 CFU/ml). Wszystkie eksperymenty powtórzono dwukrotnie. Płytki inkubowano w 37°C przez 16-20 godzin. Minimalne stężenie hamujące (MIC) było definiowane jako najniższe stężenie badanej substancji hamujące widoczny wzrost bakterii. Minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) było definiowane jako najniższe stężenie badanej substancji uniemożliwiające tworzenie kolonii po przeniesieniu próbki na płytkę agarową (po inkubacji 1 μ L inokulum z każdej z 96 rynienek był wysiewany na krwawą płytkę agarową, po czym owe płytki inkubowano przez 24 godziny w 37°C). Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako frakcjonowane stężenie hamujące (FIC index), które wyliczono w następujący sposób: $FIC = [A]/MIC_A + [B]/MIC_B$, gdzie MIC_A i MIC_B są minimalnymi stężeniami hamującymi substancji A i B użytymi indywidualnie natomiast $[A]$ i $[B]$ są minimalnymi stężeniami hamującymi substancji A i B użytymi w kombinacji. FIC index równy 1.0 świadczy o aktywności addytywnej (podwójne zmniejszenie MIC każdego składnika użytej kombinacji), index <0.5 świadczy o synergizmie, natomiast $FIC > 4$ obrazuje efekt antagonistyczny.

4. Wyniki

4.1. Analiza lekooporności badanych izolatów *Staphylococcus aureus*

Wrażliwości 81 szczepów *Staphylococcus aureus* na antybiotyki badano wykorzystując penicylinę (*P*), oksacylinę (*OX*), klindamycynę (*CC*), erytromycynę (*E*), doksycylinę (*D*) i ciprofloksacynę (*CIP*). Uzyskane wyniki przedstawione są w tabeli nr 6a. W tabeli 6b przedstawiono zakresy oporności szczepów na antybiotyki (strefy zahamowania wzrostu podane w mm).

Tab. 6a. Strefy zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus* (w mm) uzyskane metodą dyfuzyjno-krażkową w agarze.

Nr szczepu	P	OX	CC	E	D	CIP
1	11	18	29	25	29	24
2	18	20	32	30	19	28
3	18	21	30	31	33	31
4	18	21	18	30	30	30
5	22	18	30	30	30	30
6	16	20	28	26	30	30
7	14	19	24	25	30	32
8	12	23	24	23	26	30
9	19	20	33	30	30	30
10	30	22	29	26	27	30
11	15	21	28	21	26	32
12	10	20	26	21	27	27
13	32	26	30	27	12	30
14	33	24	24	25	12	30
15	20	22	30	30	24	34
16	11	24	27	30	24	27
17	11	20	30	30	30	30
18	13	21	23	24	14	29
19	14	23	6	6	12	32
20	18	20	30	30	12	30
21	19	21	29	30	30	32
22	16	22	30	28	32	30
23	15	21	25	26	27	25
24	16	20	6	6	32	32
25	20	19	6	6	32	32
26	16	18	6	6	15	32
27	17	18	21 MLS _B	6	32	31
28	17	19	22 MLS _B	6	32	32
29	30	20	30	28	30	31

Nr szczepu	P	OX	CC	E	D	CIP
30	16	20	30	26	25	31
31	34	21	24	26	27	30
32	32	21	22	24	25	22
33	30	23	33	34	12	30
34	17	20	32	30	30	34
35	15	24	28	30	28	30
36	16	20	29	29	31	33
37	13	21	6	6	12	25
38	15	22	22 MLS _B	6	28	32
39	16	21	25 MLS _B	6	31	28
40	15	22	32	30	12	30
41	18	21	28 MLS _B	6	30	28
42	15	21	28	26	15	33
43	18	20	30	30	32	32
44	12	18	30	27	25	31
45	16	22	30	28	22	32
46	16	20	26	27	30	31
47	15	19	30	28	30	31
48	13	20	30	25	30	30
49	15	19	23	23	30	32
50	14	19	22	24	28	31
51	12	16	25	21	30	32
52	12	18	27	24	27	26
53	11	18	29	25	29	24
54	26	21	27	28	28	24
55	19	21	32	31	21	31
56	18	19	21 MLS _B	6	32	32
57	19	18	6	6	16	32
58	12	20	24	23	26	27
59	12	19	24	23	24	29
60	14	18	24	24	25	28
61	15	17	24	24	25	27
62	16	20	29 MLS _B	6	12	22
63	18	17	6	6	18	28
64	22	19	24	23	25	30
65	10	18	20	23	25	27
66	14	19	20	21	20	30
67	14	18	23	20	26	30
68	12	20	25	20	24	29
69	30	23	24	23	10	31
70	30	22	23	23	11	28
71	12	20	25	23	20	32
72	26	20	6	6	24	32
73	14	20	30	23	22	26
74	16	20	22	26	22	30
75	32	16	21	23	20	32
76	14	20	22	21	22	30
77	12	16	22	23	10	32
78	13	22	24	23	26	30
79	17	21	28	17	29	29
80	14	20	25	16	18	30
81	14	20	25	16	18	30

Tab. 6b. Wrażliwość szczepów na antybiotyki.

Antybiotyki	oporny	średnio wrażliwy	wrażliwy
P	poniżej 28		powyżej 29
OX	poniżej 9	między 10 – 13	powyżej 21
CC	poniżej 14	między 10 - 20	powyżej 21
E	poniżej 13	między 14 - 22	powyżej 23
D	poniżej 12	między 13 - 17	powyżej 18
CIP	poniżej 15	między 16 - 20	powyżej 21
MLS _B	szczep oporny na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B		

Wszystkie badane szczepy okazały się wrażliwe na oksacylinę, co świadczy o braku szczepów metycylinoopornych (MRSA) w badanej grupie. Najbardziej aktywnym antybiotykiem wobec badanych izolatów była ciprofloksacyna – nie było ani jednego szczepu wykazującego oporność w stosunku do tego antybiotyku.

Na podstawie wzoru lekooporności wyodrębniono 10 fenotypów spośród 81 badanych szczepów, które przedstawiono w tabeli nr 7.

Tab. 7. Fenotypy *Staphylococcus aureus* wyodrębnione na podstawie wzorów lekooporności.

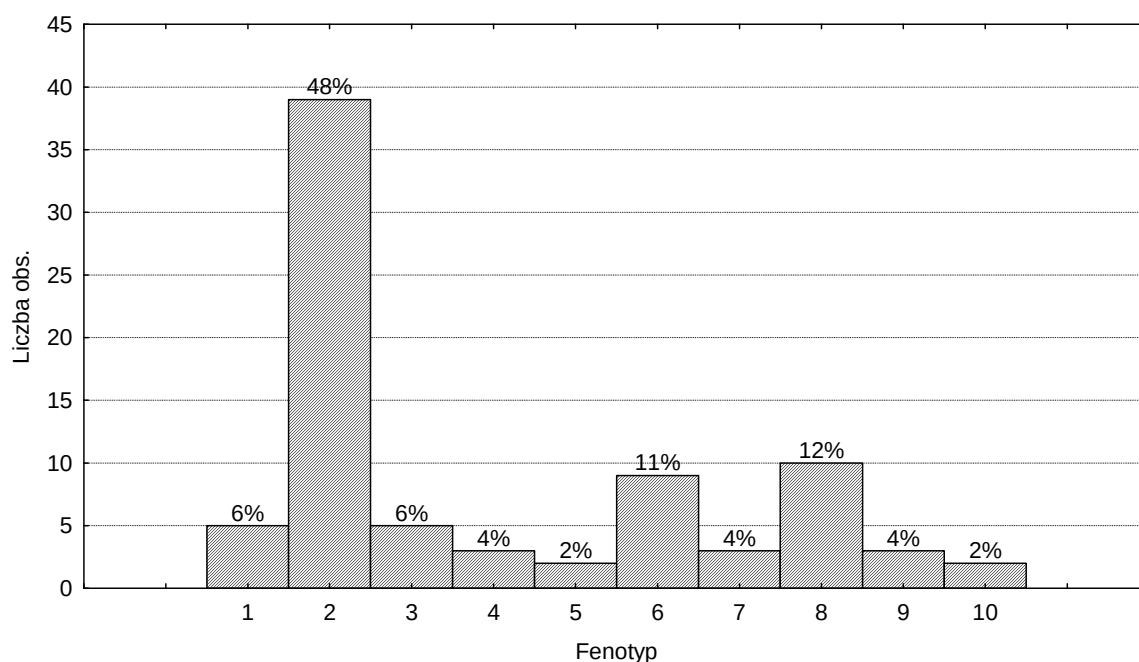
Fenotyp	Wzór lekooporności	Liczba szczepów
1	WW	5
2	P op	40
3	D op	5
4	P op D op	3
5	P op D sw	2
6	P op E sw	8
7	P op CC sw	3
8	P op E op CC op	10
9	P op E op CC op D op	3
10	P op E op CC op D sw	2

Skróty: WW – szczep wielowrażliwy (wykazujący wrażliwość na wszystkie testowane antybiotyki); op – szczep oporny; sw – szczep średnio wrażliwy.

Najczęściej obserwowanym wzorem oporności był fenotyp nr 2 (oporny na penicylinę i wrażliwy w stosunku do pozostałych testowanych antybiotyków), stwierdzony dla 48% badanych szczepów.

W przypadku identyfikacji fenotypu oporności na makrolidy i linkozamidy u *Staphylococcus aureus* należy ocenić czy jest to oporność konstytutywna czy indukcyjna. Jeżeli badany szczep jest wrażliwy na erytromycynę a oporny na klindamycynę nie powinno się stosować linkozamidów. W przypadku gdy analizowany szczep jest oporny na erytromycynę i klindamycynę mówimy o oporności MLS_B konstytutywnej, która uniemożliwia zastosowanie w terapii żadnych makrolidów czy linkozamidów. W sytuacji, gdy analizowany szczep jest oporny na erytromycynę

a wrażliwy na klindamycynę ale obserwujemy spłaszczenie strefy zahamowania wzrostu mówimy o oporności MLS_B indukcyjnej, która również wyklucza zastosowanie makrolidów i linkozamidów (wytyczne zawarte w *Mikrobiologia Medycyna nr 3 (40) 2004*). W badanej puli 81 szczepów oporność MLS_B indukcyjną stwierdzono w 7 przypadkach (szczepy nr: 27, 28, 38, 39, 41, 56 i 62).

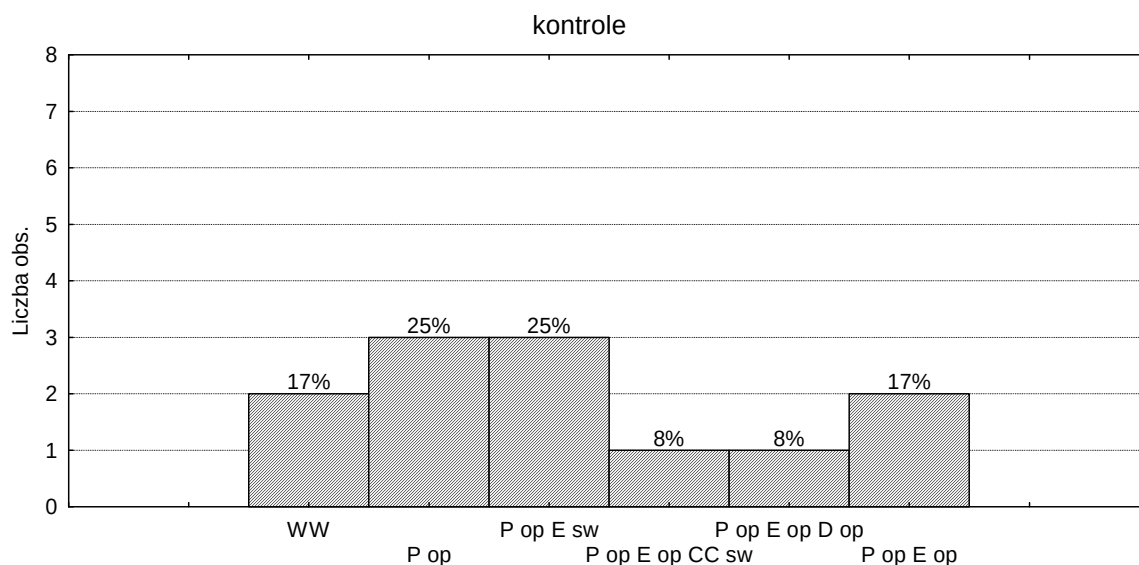


Ryc. 15. Występowanie poszczególnych fenotypów oporności w badanej puli szczepów.

W grupie 46 chorych izolaty pochodzące z czyraka oraz nosa i/lub gardła prezentowały identyczny wzór lekooporności. Tylko u 2 pacjentów materiały te różniły się pod względem wrażliwości na antybiotyki (szczepy nr 75 i 77 oraz 35 i 42). Interesującym wydaje się fakt, że czas trwania choroby nie wpływał na oporność badanych izolatów – szczepy odporne na więcej niż dwa testowane antybiotyki izolowane były od chorych z krótkim wywiadem chorobowym (3 – 11 miesięcy). Natomiast szczepy wielowrażliwe i odporne na penicylinę występowały u pacjentów chorujących rok i dłużej, a co się z tym wiąże, przyjmujących większe ilości antybiotyków.

Wśród 81 badanych szczepów opornych na penicylinę było 72 (88.9%), klindamycynę 15 (18.5%), erytromycynę 15 (18.5%), zaś na doksycyklinę 11 (13.5%).

Szczep referencyjny ATCC 29213 był odporny na penicylinę a wrażliwy w stosunku do pozostałych analizowanych antybiotyków.



Ryc. 16. Analiza oporności na antybiotyki szczepów *Staphylococcus aureus* uzyskanych od grupy kontrolnej.

Grupę kontrolną stanowiło 30 studentów IV roku medycyny, od których pobrano wymazy z nosa i gardła. Nosicielstwo gronkowca złocistego stwierdzono u 12 osób a oporność uzyskanych szczepów przedstawia ryc. 16. Nie obserwowano natomiast szczepów opornych na klindamycynę, ciprofloksacynę i oksacylinę.

4.2. Rezultaty typowania fagowego

Tab.8. Wyniki typowania bakteriofagowego szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyracczością nawrotową.

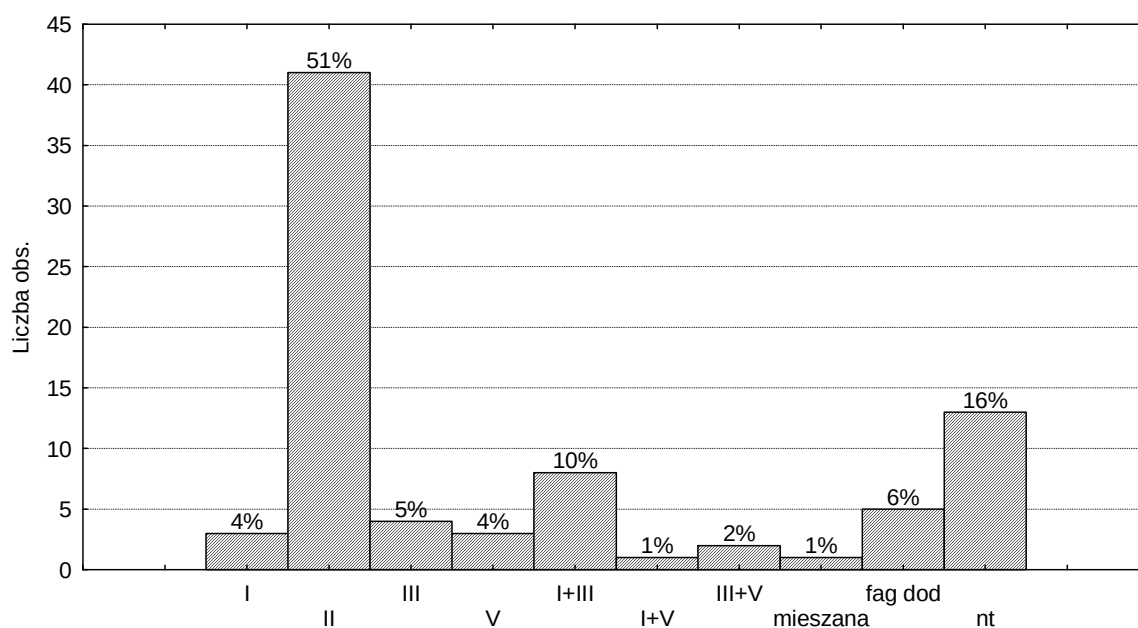
Nr szczepu	Zestaw fagów podstawowych
2, 3, 4, 5, 8, 16, 23, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 54, 55, 58, 59, 60, 61	3C++
6, 7, 31, 32, 43, 56, 62, 69, 70, 72	NT//NT
11, 12, 49	NT//95+
13, 14, 17, 64, 73, 74, 76, 79, 80, 81	3C++, 71+
18, 19	29+, 52++, 52A++/53++, 75++, 83A++, 84++ szczep lizogenny
22, 52	3A+, 3C++
24, 25, 27, 28, 29, 41	81±/81++, 75++
20, 44, 45, 75	3A±, 3C++
21, 46, 47	80±, 81++
48, 65, 67	6±, 42E++, 47++, 53±, 83A++, 85++
15, 30, 50, 53, 78	187++
9, 26, 51	95++
63, 66, 68	NT//3C++, 71++
1, 10, 71	55+, 71++
38, 39	6++, 47++, 53++, 83A++, 89++/ 94+, 96++

Nr szczepu	Zestaw fagów podstawowych
57	53±, 83A±, 89±// 81++, 3C+/42E++, 53++, 83A+, 85+, 89++
77	29++, 52++, 52A++, 79+, 80++, 81++/ 94++, 95++, 96
40	53++, 75++, 83A++
ATCC 29213	42E++, 47++, 53++, 77++, 85++, 89++

Objaśnienia: ++ silna reakcja, +, ± słaba reakcja

Tab. 9. Zestawienie grup fagowych analizowanych szczepów bakteryjnych.

Grupa fagowa	Szczepy
I	21, 46, 47
II	1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 44, 45, 52, 54, 55, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 66, 68, 71, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81
III	40, 48, 65, 67, ATCC 29213
IV	-
V	9, 26, 51
I+III	18, 19, 24, 25, 27, 28, 29, 41
I+V	77
III+V	38, 39
Mieszana	57
Fag dodatkowy	15, 30, 50, 53, 78
Nietypowalna	6, 7, 11, 12, 31, 32, 43, 49, 56, 62, 69, 70, 72



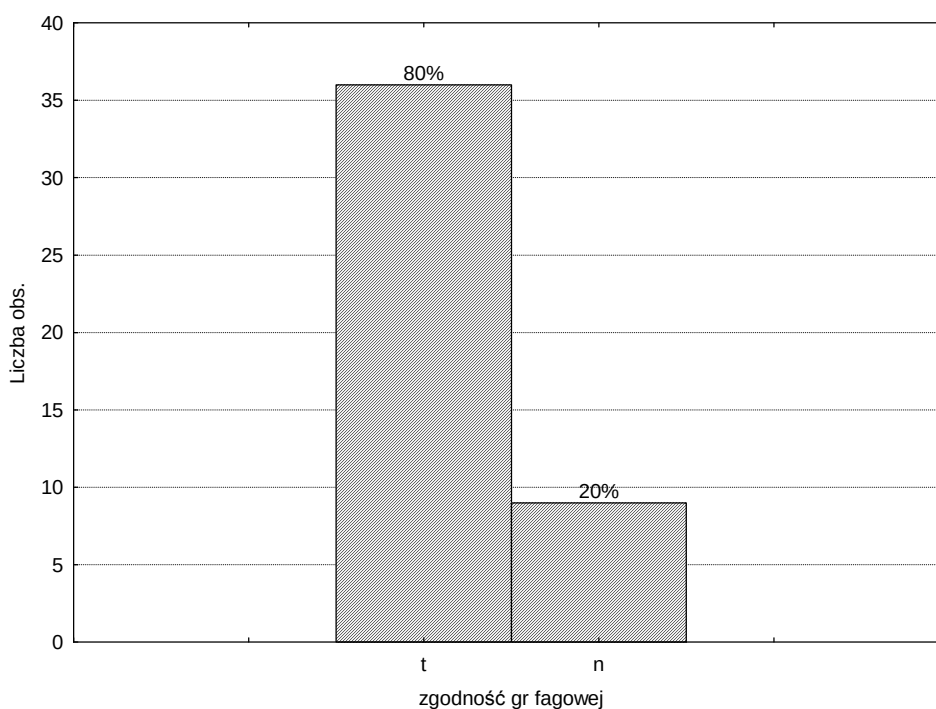
Ryc. 17. Typy fagowe występujące w puli badanych szczepów *Staphylococcus aureus*.

Na podstawie uzyskanych wyników typowania bakteriofagowego można stwierdzić, że w puli badanych szczepów dominuje II grupa fagowa, którą stwierdzono u 41 szczepów. 13 analizowanych szczepów nie poddało się typowaniu przy pomocy standardowego zestawu fagów. I grupę fagową stwierdzono w 3 przypadkach, III grupę w 5 przypadkach (włącznie ze szczepem referencyjnym), V w kolejnych 3, natomiast tzw.

fag dodatkowy charakterystyczny był dla 5 szczepów. Przynależność do dwóch grup fagowych (I+III, I+V, III+V) stwierdzono odpowiednio dla 8, 1 i 2 szczepów. Mieszaną grupę fagową zaobserwowano dla jednego szczepu (ryc. 17). Dokładne zestawienie grup fagowych i przynależących do nich szczepów gronkowca złocistego przedstawia tabela nr 9.

W grupie kontrolnej wszystkie szczepy demonstrowały przynależność do drugiej grupy fagowej.

Wśród 45 osób, u których wyizolowano 2 lub więcej szczepów, u 36 osób (80%) szczepy wykazywały zgodność grupy fagowej, natomiast u 9 osób (20%) grupy fagowe w różnych szczepach były odmienne (ryc. 18).



Ryc. 18. Przynależność do tej samej (80%) lub różnej (20%) grupy fagowej szczepów izolowanych ze zmiany skórnej i nosa lub gardła.

4.3. Badanie nosicielstwa *Staphylococcus aureus* wśród pacjentów z czyracznością nawrotową

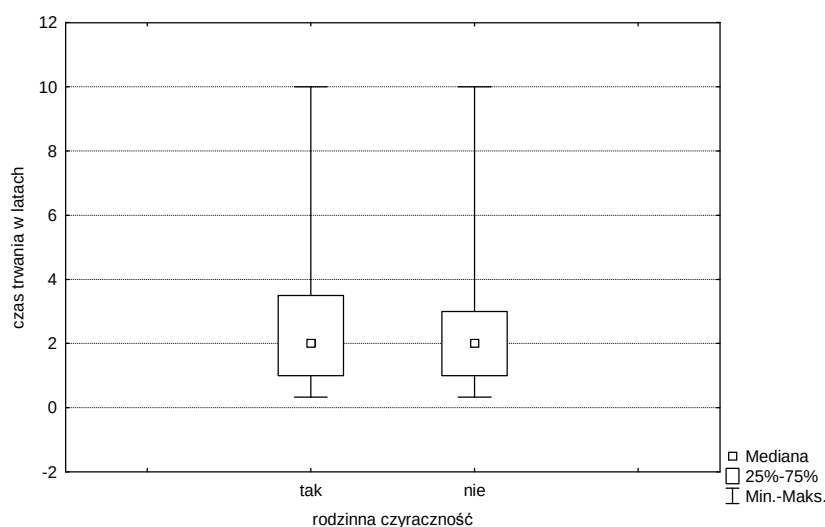
Nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w nosie i/lub gardle stwierdzono u 60.8% chorych z czyracznością nawrotową a u 40% osób w grupie kontrolnej. Nie udało się zbadać nosicielstwa u rodzin ponad 50% badanych pacjentów, gdyż nie zgłaszali się oni na badania w wyznaczonych terminach.

4.4. Rodzinne występowanie czyraczności wśród pacjentów z czyracznością nawrotową

W badanej grupie 56 osób znalazło się 9 rodzin z czyracznością nawrotową w wywiadzie. W 5 rodzinach zmiany skórne występowały u 2 członków rodziny, w 3 rodzinach u 3 członków a w jednej z rodzin u 4 członków rodziny. Tylko w 2 rodzinach zmiany występowały u dwóch ich członków jednocześnie w dniu zgłoszenia się na badanie. W pozostałych siedmiu rodzinach zmiany pojawiały się u poszczególnych członków w różnym czasie, w odstępach od 1.5 miesiąca do 8 miesięcy. W dwóch obserwowanych rodzinach czyraki nawracały od 3 lat, średnio 2 razy w roku.

4.5. Badanie zależności między czasem trwania choroby a opornością na antybiotyki i fagotypem u pacjentów indywidualnych i chorych z czyracznością rodzinną

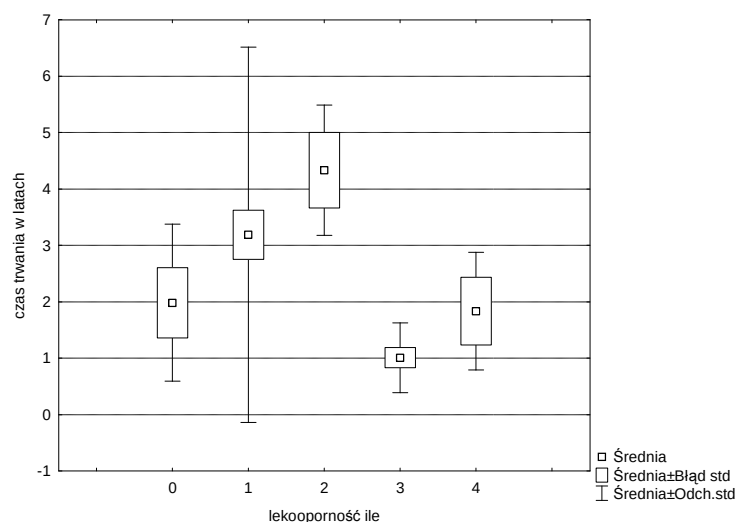
Na podstawie testu U Manna-Whitneya ($p=0.6$) nie stwierdzono różnic w czasie trwania choroby między chorymi ze stwierdzoną rodzinną czyracznością i u pacjentów indywidualnych z czyracznością przewlekłą.



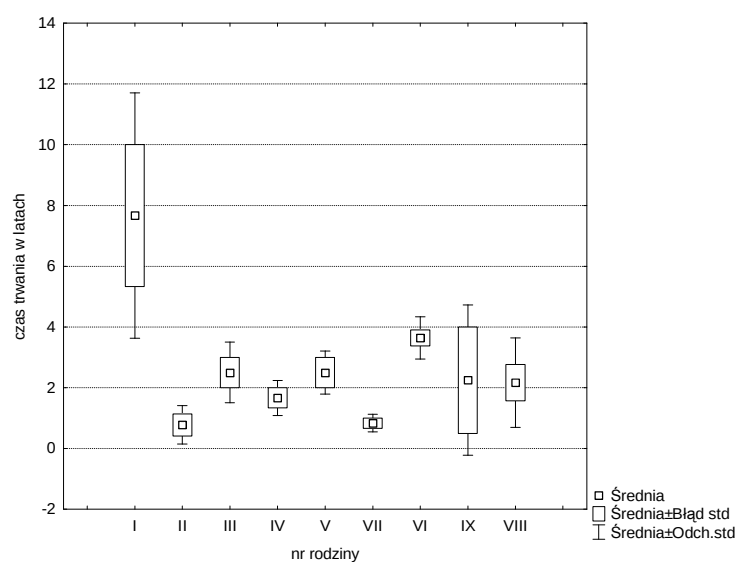
Ryc. 19. Wykres przedstawia brak różnic statystycznych między czasem trwania choroby (w latach) u pacjentów indywidualnych i pacjentów z czyracznością rodzinną.

Poniższy wykres (ryc. 20) przedstawia brak zależności między czasem trwania choroby (w latach) a opornością na antybiotyki wyliczony przy pomocy testu Kruskala-Wallisa:

$$H(4, N = 81) = 14.20106 \quad p = 0.0067$$



Ryc. 20. Wykres przedstawia brak wpływu czasu trwania choroby na oporność na antybiotyki izolowanych szczepów *Staphylococcus aureus* (na osi X 0 oznacza szczep wielowrażliwy (WW), 1- oporny na 1 antybiotyk, 2- oporny na 2 antybiotyki, 3- oporny na 3 antybiotyki i 4 – oporny na 4 antybiotyki).



Ryc. 21. Wykres przedstawia czas trwania choroby w poszczególnych rodzinach (I-IX) z czyracnością przewlekłą (Test Kruskala-Wallisa: $H(8, N = 33) = 18.08014$ $p = 0.0206$).

4.6. Wyniki uzyskane przy pomocy metod genetycznych

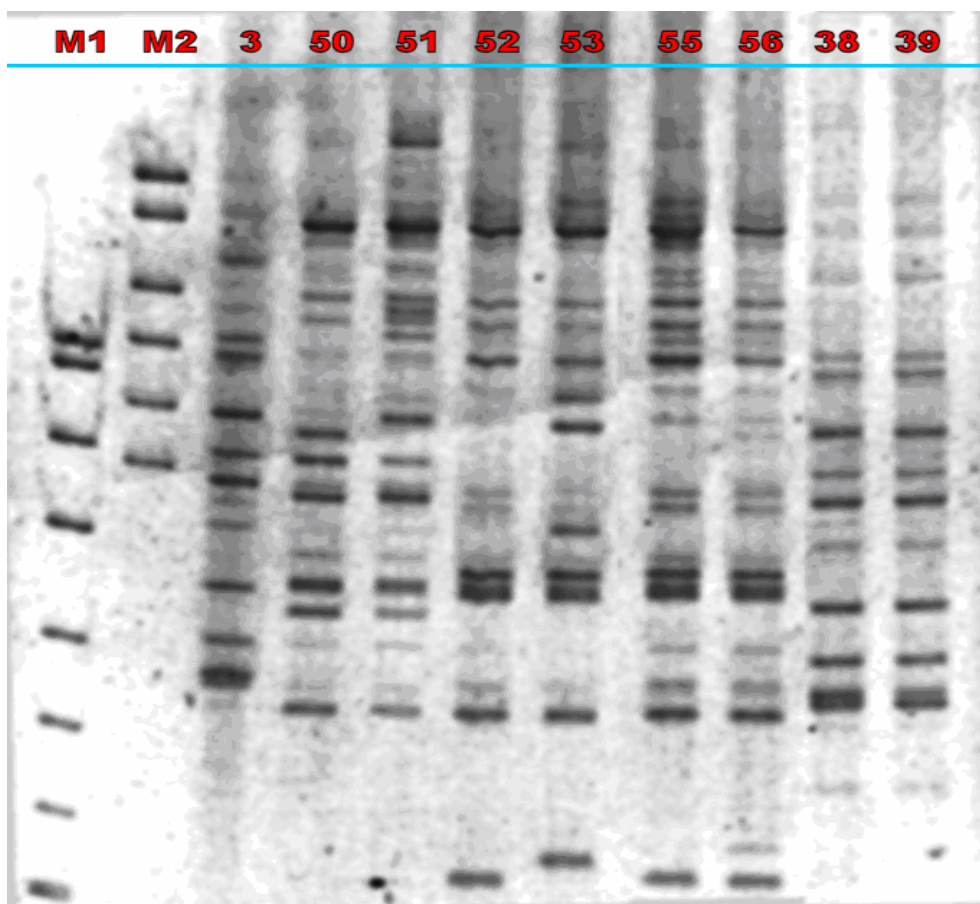
Genotypowaniu za pomocą technik ADSRRS – fingerprinting, RAPD – PCR i PFGE poddano odpowiednio 81, 40 i 13 izolatów. Podstawową metodą typowania był ADSRRS – fingerprinting, a dla potwierdzenia otrzymanych wyników zastosowano dwie kolejne metody.

Tab. 10. Zestawienie genotypów uzyskanych przy pomocy techniki ADSRRS – fingerprinting i odpowiadających im szczepów *Staphylococcus aureus*.

Genotyp	Nr szczepu
A	10, 11, 12
B	20, 38, 39
C	6, 8, 75
D	32, 21
E	3, 57, 58, 59, 60
F	13, 14, 15, 27, 42, 45, 77
G	17, 80
H	33, 70
I	69, 74
J	81
K	73, 76, 79
L	5
M	19, 31
N	2
O	9, 22, 24, 36
P	18, 41, 44, 48, 56
Q	1
R	4, 54, 55, 66, 68
S	7
T	37
U	16, 40
W	78
X	63, 65, 67
Y	71
Z	34, 35
AA	29, 46, 47
AB	49
AC	43, 51
AD	25, 26
AE	52
AF	53

Technika ADSRRS – fingerprinting umożliwiła rozróżnienie 31 genotypów oznaczonych od A do AF (tab 10). W przypadku 8 izolatów nie uzyskano rozdziału elektroforetycznego w 6% żelu poliakrylamidowym umożliwiającego precyzyjne określenie genotypu. Pięć najczęstszych genotypów to F (7 izolatów), E, P i R (po 5 izolatów każdy) oraz O (4 izolaty). Szesnaście kolejnych genotypów mających od 2

do 3 izolatów, grupowało 39 izolatów. Pozostałe 11 genotypów było charakterystycznych dla pojedynczych izolatów.

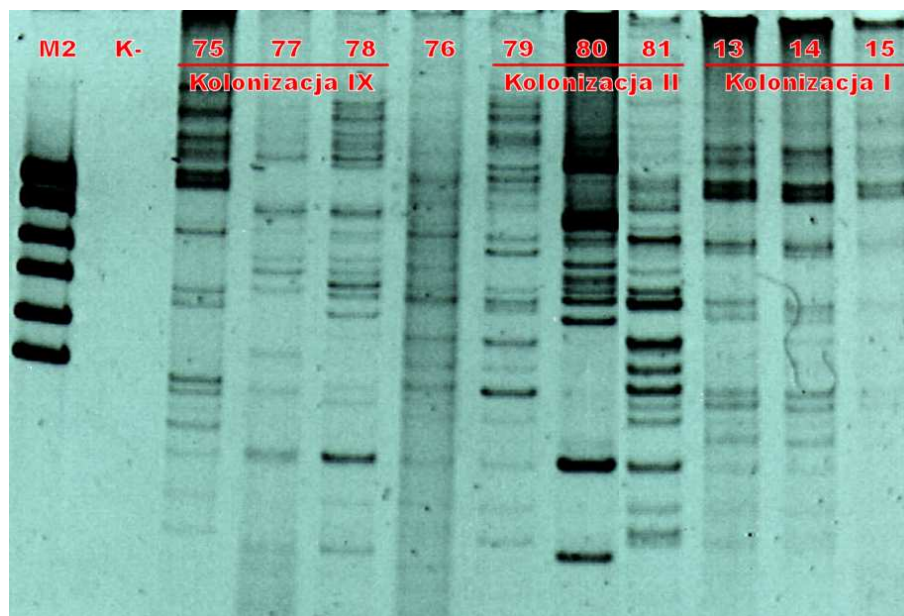


Ryc. 22. Przykładowy żel elektroforetyczny wyników uzyskanych przy pomocy techniki ADSRRS – fingerprinting.. Kolumna oznaczona M1 zawiera molekularny marker wielkości DNA(501, 489, 404, 331, 242 i 190 pz), natomiast M2 - molekularny marker wielkości (1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz). Numery nad kolumnami odpowiadają szczepom *Staphylococcus aureus*. Szczepy 38 i 39 reprezentują ten sam genotyp.

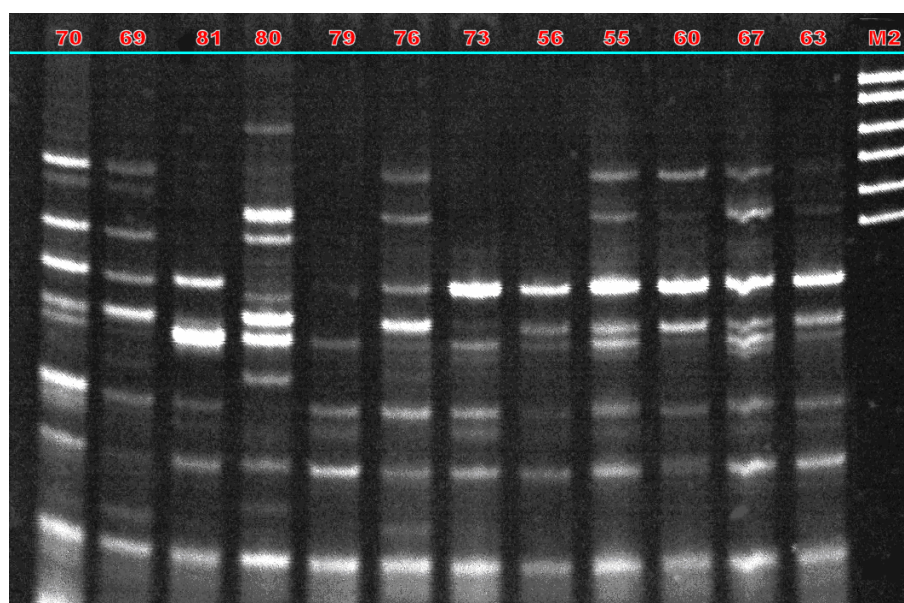
W grupie kontrolnej obejmującej 12 szczepów *Staphylococcus aureus* wyodrębniono 5 różnych genotypów przy pomocy techniki ADSRRS – fingerprinting.

Szczep referencyjny ATCC29213 identyfikowany przy pomocy tej metody prezentował odmienny genotyp niż szczepy uzyskane od pacjentów z czyraczną nawrotową i grupy kontrolnej.

Wyniki uzyskane przy pomocy techniki RAPD – PCR były zgodne w większości przypadków z otrzymanymi przy użyciu ADSRRS – fingerprinting (przykładowe zdjęcie przedstawione jest na ryc. 22). Widać, że siła różnicująca tej metody jest mniejsza niż ADSRRS-fingerprinting.



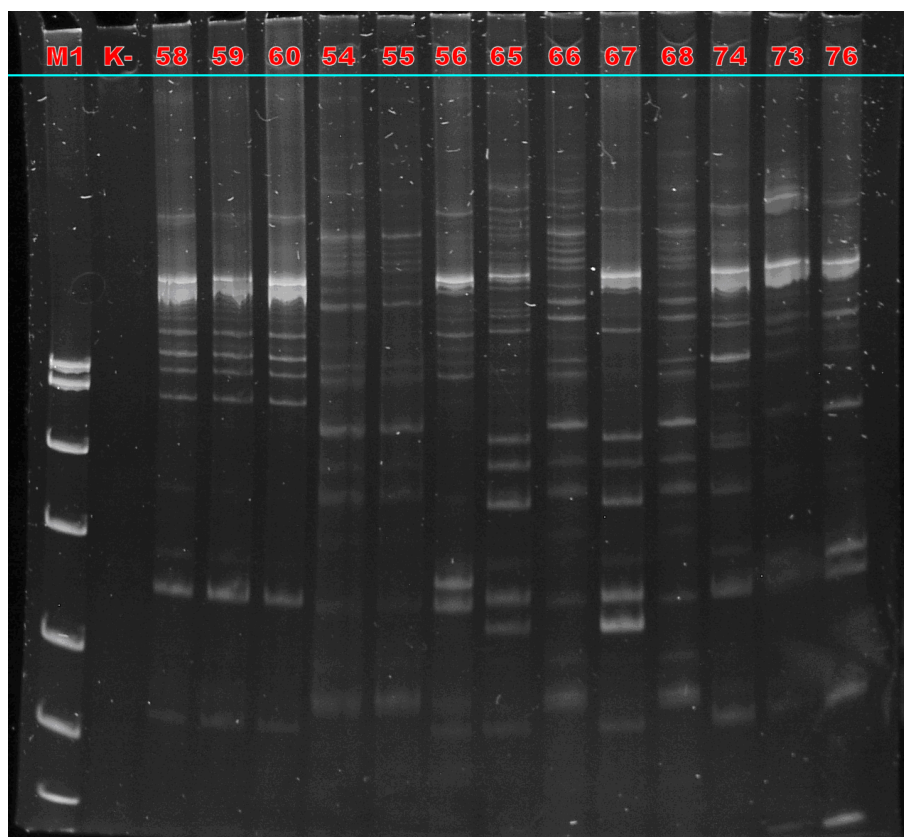
Ryc. 23. Wyniki uzyskane techniką ADSRRS – fingerprinting dla dwóch kolonizacji (szczepy *Staphylococcus aureus* uzyskane odpowiednio ze zmiany skórnej, nosa i gardła): I (szczepy 13, 14 i 15) przedstawia identyczne genotypy w odróżnieniu od II (szczepy 79, 80, 81) reprezentowanej przez różne genotypy oraz rodziny nr IX, w obrębie której każdy izolat reprezentuje inny genotyp (szczepy 75, 77, 78). M2 - molekularny marker wielkości (1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz). K- – kontrola ujemna.



Ryc. 24. Przykładowy żel elektroforetyczny wyników uzyskanych techniką RAPD - PCR. M2- molekularny marker wielkości DNA (1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz), studzienki 70, 69, 81, 80, 79, 76, 73, 56, 55, 60, 67, 63 odpowiadają izolatom *Staphylococcus aureus*.

Do genotypowania wybranych 13 izolatów uzyskanych od pacjentów z czyraczną rodziną wykorzystano technikę PFGE. Rezultaty uzyskane tą techniką zestawiono z wynikami otrzymanymi metodą ADSRRS – fingerprinting (ryc. 23 i 24)

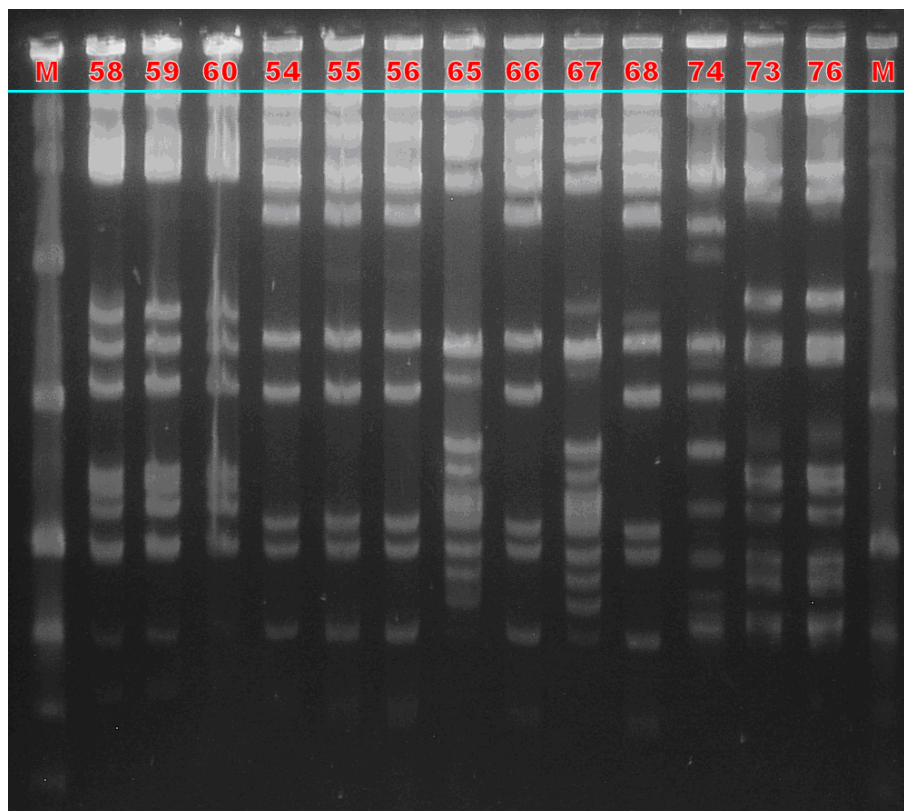
i przeanalizowano dokładnie pod kątem wyników uzyskanych przy pomocy metod fenotypowych i genotypowych w tabeli nr. 11.



Ryc. 25. Przykładowy żel elektroforetyczny wyników typowania metodą ADSRRS-fingerprinting uzyskanych dla czterech rodzin z czyracnością rodzinną. Kolumna oznaczona M1 zawiera molekularny marker wielkości DNA (501, 489, 404, 331, 242 i 190 pz), K- - kontrola ujemna. Rodzinę I reprezentują szczepy 58, 59, 60; II – 54, 55, 56; III- 65, 66, 67, 68 i IV- 76, 73, 74.

Tabela 11 ilustruje przykładowe zestawienie 13 szczepów bakteryjnych uzyskanych od członków 4 rodzin ze zdiagnozowaną czyracnością. Porównano wyniki uzyskane przy pomocy metod fenotypowych (oznaczanie wrażliwości na antybiotyki i typowanie fagowe) i genotypowych (identyfikacja DNA bakteryjnego technikami ADSRRS-fingerprinting i PFGE).

W jednej spośród prezentowanych czterech rodzin czyraki występowały w dniu badania u dwóch członków rodziny. W pozostałych trzech rodzinach aktywne zmiany skórne występowały u jednego z domowników, u pozostałych były w fazie gojenia i nie udało się uzyskać treści ropnej do badania. Od tych osób pobrano tylko badania w kierunku nosicielstwa z jamy nosowo – gardłowej.



Ryc. 26. Przykładowy żele elektroforetyczny wyników typowania PFGE uzyskany dla czterech rodzin z czyracnością rodzinną. M- molekularny marker wielkości fragmentów DNA (konkatamery faga λ , Biodra 170-3635). Rodzinę I reprezentują szczepy 58, 59, 60; II – 54, 55, 56; III- 65, 66, 67, 68 i IV- 76, 73, 74.

W rodzinie I zmiany skórne wywoływał ten sam szczep bakteryjny co potwierdzają wszystkie uzyskane wyniki – identyczny wzór lekooporności, przynależność do tej samej grupy fagowej i identyczny genotyp zidentyfikowany dwiema niezależnymi metodami. W rodzinie II zmiany wywoływały 2 różne szczepy różniące się zarówno wzorem oporności jak i grupą fagową (szczep nr 56 nie poddał się typowaniu przy pomocy standardowego zestawu fagów). Niespodziewanie technika PFGE nie rozróżniła tych szczepów (na ryc. 26 szczepy 54, 55 i 56 prezentują identyczny wzór elektroforetyczny) podczas gdy na żelu uzyskanym przy pomocy techniki ADSRRS-fingerprinting różnica między szczepem nr 56 a 54 i 55 jest ewidentna.

Tab. 11. Tabela przedstawia analizę porównawczą szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od poszczególnych członków 4 rodzin z czyracznością rodzinną.

Rodzina	Pacjent w rodzinie	Nr szczepu	Miejsce izolacji materiału	Oporność	Grupa fagowa	Genotyp według ADSRRS fingerprinting	Genotyp według PFGE
I	Pacjent I	58	czyrak	P	II	E	a
I	Pacjent II	59	czyrak	P	II	E	a
I	Pacjent II	60	nos	P	II	E	a
II	Pacjent I	54	czyrak	P	II	R	b
II	Pacjent II	55	czyrak	P	II	R	b
II	Pacjent III	56	nos	P, E, CC	NT	P	b
III	Pacjent II	65	gardło	P, CCsw	III	X	c
III	Pacjent II	66	czyrak	P, Esw	II	R	b
III	Pacjent I	67	nos	P, CCsw	III	X	c
III	Pacjent II	68	nos	P, Esw	II	R	b
IV	Pacjent I	74	nos	P, Esw	II	I	d
IV	Pacjent II	73	czyrak	P	II	K	e
IV	Pacjent II	76	gardło	P	II	K	e

W rodzinie III izolaty uzyskane z gardła i nosa od dwóch osób (szczepy 65 i 67) prezentują identyczny fenotyp i genotyp, podczas gdy izolaty uzyskane z czyraka i nosa (szczepy 66 i 68) przynależą również do jednego fenotypu i genotypu, różnego jednak niż szczep izolowany z nosa.

W rodzinie IV pacjent z aktywnym czyrakiem jest nosicielem w nosie tego samego szczepu, który odpowiedzialny był u niego za zmiany skórne (szczepy 73 i 76), natomiast drugi członek rodziny ma stwierdzone nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w nosie, ale badany szczep (nr 74) prezentuje inny genotyp mimo identyczności fenotypowej.

Podsumowując wyniki uzyskane przy pomocy metod PCR można stwierdzić, iż w większości przypadków szczepy bakteryjne izolowane od jednego pacjenta (ze zmiany skórnej, nosa i/lub gardła) prezentowały genetyczne podobieństwo umożliwiające zaliczenie ich do tego samego genotypu.

4.7. Ocena wrażliwości szczepów *Staphylococcus aureus* w stosunku do naturalnych peptydów antybakteryjnych

Do badań nad aktywnością bakteriobójczą wybranych peptydów antybakteryjnych wybrano 21 szczepów bakteryjnych reprezentujących 21 różnych genotypów. Oceniano właściwości antybakteryjne laktoferryiny, lizozymu, LL-37 i hBD3 w stosunku do szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od chorych z czyracznością nawrotową.

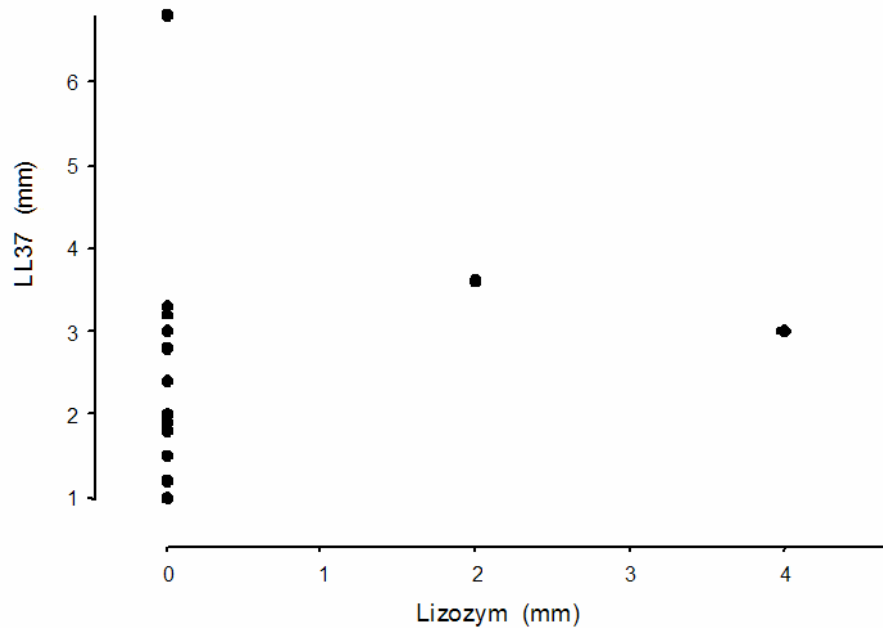
Aktywność antybakteryjną laktoferryiny, lizozymu i LL-37 oceniano przy pomocy techniki radiodyfuzji stosując stężenia 10, 50 i 100 μM każdego z peptydów, natomiast hBD3 i LL-37 przy pomocy metody jednostek tworzących kolonie.

Wszystkie badane szczepy były wrażliwe na LL-37 w stężeniu 50 μM , podczas gdy tylko 3 spośród badanych szczepów były wrażliwe na lizozym w tym samym stężeniu. (tab. 12). Wszystkie analizowane szczepy były odporne w stosunku laktoferryiny nawet przy stężeniu 100 μM . W metodzie jednostek tworzących kolonie stężenia bakteriobójcze LL-37 w stosunku do badanych szczepów były znacznie niższe niż w technice radiodyfuzji i mieściły się w granicach od 0.6 do 3 μM . Dla szczepu referencyjnego ATCC29213 wartość ta wynosiła 3 μM .

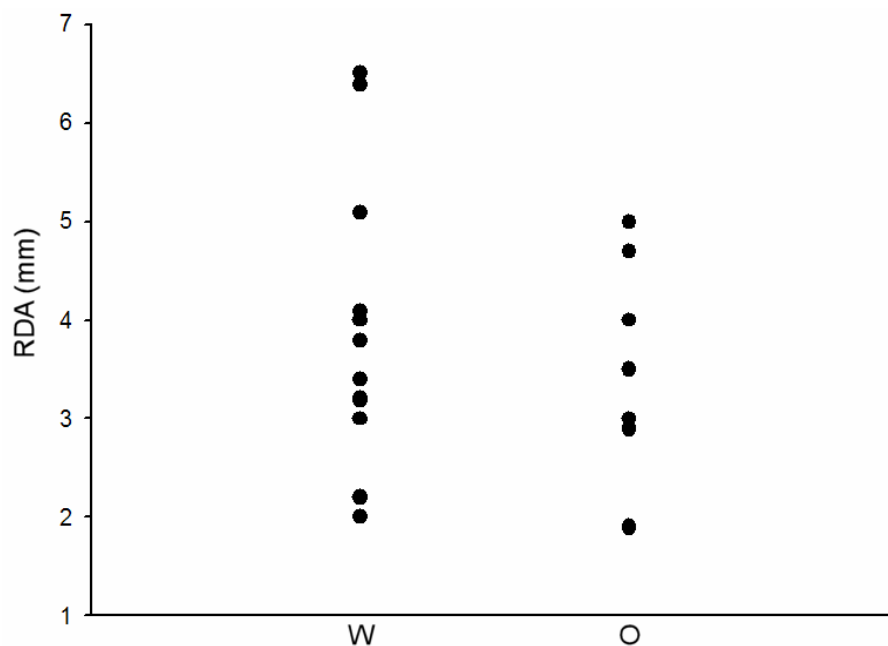
W przypadku oznaczania zdolności antybakteryjnej hBD-3 ustalono, że stężenia bakteriobójcze tego peptydu w stosunku do analizowanych szczepów *Staphylococcus aureus* wynoszą od 3 do 5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla szczepu referencyjnego 2 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.1. Poszukiwanie korelacji między wrażliwością badanych szczepów na antybiotyki i peptydy antybakteryjne

Przeprowadzono analizę możliwych zależności między wrażliwością/opornością na antybiotyki a wrażliwością/opornością na naturalne peptydy antybakteryjne. Wyniki uzyskane przy pomocy techniki radiodyfuzji (RDA) pozwoliły na wyodrębnienie trzech szczepów wrażliwych na lizozym w stężeniu 50 μM spośród 21 badanych szczepów. Te same trzy szczepy demonstrowały dużą wrażliwość w stosunku do LL-37 (tab. 12). Pozostałe izolaty odporne na lizozym prezentowały zbliżone wielkością strefy zahamowania wzrostu po zastosowaniu LL-37, a różnice nie były istotne statystycznie. Ponadto szczepy wrażliwe na lizozym nie odznaczały się większą wrażliwością w stosunku do testowanych antybiotyków (penicyliny, oksacyliny, doksycykliny, erytromycyny, klindamycyny czy ciprofloksacyny) niż szczepy odporne na lizozym.



Ryc. 27a. Wykres prezentuje brak korelacji między wrażliwością na LL- 37 i lizozym. Oś X przedstawia wrażliwość badanych szczepów w stosunku do lizozymu odpowiadającą średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii w RDA, natomiast oś Y odpowiada wrażliwości na LL-37 wyrażonej średnicą zahamowania wzrostu (w mm).



Ryc. 27b. Wykres ten przedstawia brak korelacji między wrażliwością (W) i opornością (O) na erytromycynę a wrażliwością na LL-37 w RDA.

Podobnie nie znaleziono korelacji między wrażliwością na penicylinę, klindamycynę i erytromycynę a wrażliwością na LL-37 (w RDA). Ryc. 27a i 27b przedstawiają aktywność LL-37 w stosunku do szczepów *Staphylococcus aureus*

wrażliwych i opornych na erytromycynę. Niezależnie od oporności na poszczególne antybiotyki, wszystkie badane szczepy były wrażliwe na LL-37.

4.7.2. Badanie interakcji między peptydami oraz peptydami i antybiotykami

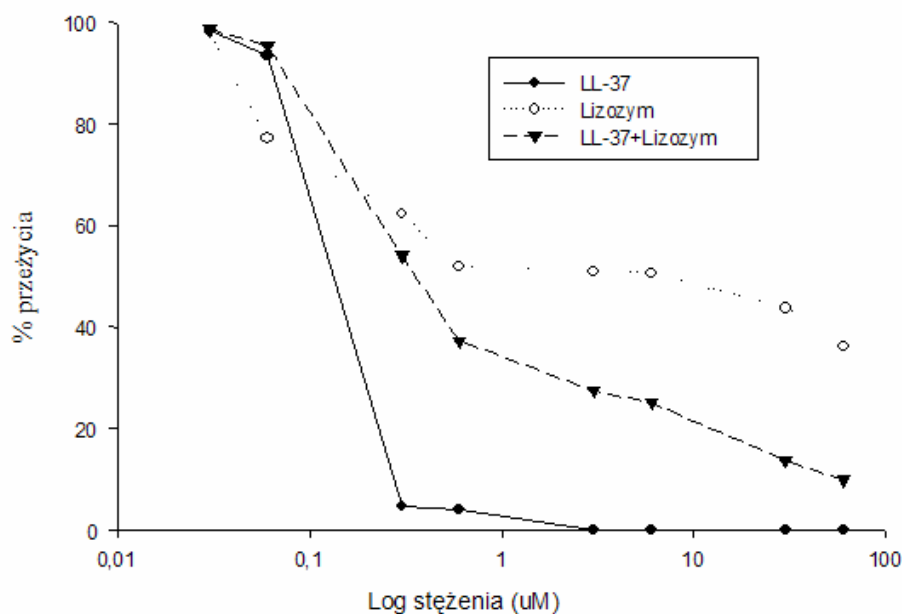
Mechanizm działania lizozymu polega na aktywacji autolizy komórki bakteryjnej podczas gdy działanie antybakteryjne LL-37 wynika z bezpośredniego wiązania się z błoną komórkową patogenu i zwiększenie jej przepuszczalności poprzez tworzenie porów, co prowadzi do destrukcji drobnoustroju. Ta różnica skłania do postawienia sobie pytania, czy te dwa peptydy będące składową ludzkiej odporności wrodzonej są w stanie działać synergistycznie w obliczu infekcji. Po przeprowadzeniu serii doświadczeń przy użyciu RDA stwierdzono zmniejszenie aktywności bakteriobójczej LL-37 w obecności lizozymu w stężeniu 50 μ M (tab. 12, ryc. 28c). Podobne wyniki uzyskano po użyciu CFU badając zarówno szczepy wrażliwe jak i oporne na lizozym. Przy zastosowaniu techniki jednostek tworzących kolonie uzyskano nieznaczny efekt antybakteryjny lizozymu w stosunku do szczepów *Staphylococcus aureus*, które nie prezentowały stref zahamowania wzrostu w RDA.

Tab. 12. Wrażliwość szczepów *Staphylococcus aureus* na lizozym, LL-37 i mieszaninę lizozymu i LL-37 w stężeniu 50 μ M uzyskana przy pomocy techniki radiodyfuzji. Wśród prezentowanych szczepów tylko 3 były wrażliwe na lizozym (15, 17 i 18); wszystkie z nich prezentowały zmniejszoną wrażliwość na LL-37 w obecności lizozymu (mniejsza strefa zahamowania wzrostu niż po użyciu samego LL-37).

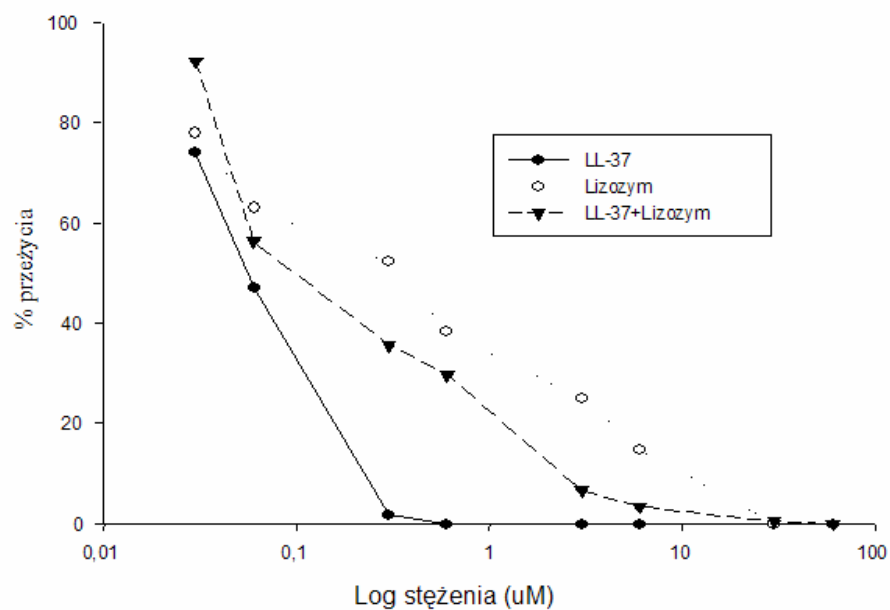
Lp. szczepów <i>S. aureus</i>	Lizozym 50 μ M (mm)	LL-37 50 μ M (mm)	Lizozym + LL-37 50 μ M (mm)
1	0	2.0	1.4
2	0	1.8	0.9
3	0	2.0	1.2
4	0	1.8	0.5
5	0	1.0	0
6	0	1.2	0
7	0	1.9	1.0
8	0	1.2	0
9	0	3.0	1.7
10	0	2.4	0
11	0	2.0	0
12	0	3.3	1.8
13	0	1.8	1.5
14	0	6.8	4.0
15	4.0	3.0	2.5
16	0	1.5	0

Lp. szczepów <i>S. aureus</i>	Lizozym 50µM (mm)	LL-37 50µM (mm)	Lizozym + LL-37 50µM (mm)
17	2.0	3.6	1.4
18	4.7	3.0	2.3
19	0	3.2	2.3
20	0	2.0	1.0
21	0	2.8	2.2

W technice CFU dla szczepów wrażliwych na lizozym uzyskano efekt bakteriobójczy przy stężeniu 30 µM omawianego peptydu, natomiast dla szczepów opornych na lizozym (w RDA) uzyskano ~ 50% zmniejszenie liczby kolonii przy tym samym stężeniu (30 µM). Wyższe dawki lizozymu (100 µM) pozwoliły na zabicie ~ 60% kolonii *Staphylococcus aureus* (ryc. 28a i 28b). Użycie metody FIC w celu weryfikacji wyników otrzymanych przy pomocy RDA i CFU pozwoliło na ustalenie MIC (minimal inhibitory cocentration, minimalnego stężenia hamującego) dla LL-37 w granicach 8-32 mg/L w zależności od badanego szczepu. Dodanie lizozymu zwiększyło MIC LL-37 do wartości 32-128 mg/L.



Ryc. 28a. Wrażliwość na LL-37, lizozym i mieszaninę obu peptydów dla szczepu *Staphylococcus aureus* opornego na lizozym uzyskana dzięki metodzie jednostek tworzących kolonie.



Ryc. 28b. Wrażliwość na LL-37, lizozym i mieszaninę obu peptydów dla szczepu *Staphylococcus aureus* dla szczepu wrażliwego na lizozym uzyskana dzięki metodzie jednostek tworzących kolonie.



Ryc. 28c. Zmniejszenie aktywności bakteriobójczej LL- 37 w obecności lizozymu w RDA.

Badania użycia kombinacji LL-37 z antybiotykami (erytromycyną, klindamycyną i doksycyliną) w stosunku do szczepów izolowanych od chorych z czyracznością nawrotową w RDA pokazały, że spośród testowanych antybiotyków tylko erytromycyna zwiększała aktywność bakteriobójczą LL-37. Dla potwierdzenia tych obserwacji zastosowano metodę frakcjonowanych stężeń hamujących stosowaną dla wykrywania interakcji synergistycznych. Ustalono, że wartości MIC dla LL-37 i erytromycyny mieściły się w granicach 8 – 64 µg/ml dla LL-37 i 2 – 4 µg/ml dla erytromycyny (w przypadku szczepów wrażliwych na ten antybiotyk). Wartości MBC (minimal bactericidal concentration – minimalne stężenie bakteriobójcze) były takie same jak MIC.

Do dalszych eksperymentów wykorzystano jeden szczep *Staphylococcus aureus* oporny (MIC dla erytromycyny > 4 µg/ml) i jeden wrażliwy na erytromycynę (MIC dla erytromycyny ~ 2 µg/ml). Badano możliwość wystąpienia efektów synergistycznych z LL-37 w obydwu przypadkach. Dla obu testowanych szczepów uzyskano index FIC < 0.5, co świadczy o oddziaływaniu synergistycznym między erytromycyną i LL-37.

5. Omówienie i dyskusja

Czyraczność nawrotowa wywoływana przez *Staphylococcus aureus* jest jednostką chorobową o złożonej i nie do końca wyjaśnionej patogenezie, sprawiającą wiele problemów terapeutycznych lekarzom różnych specjalności. W prezentowanej pracy dokonano identyfikacji szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową przy pomocy metod fenotypowych (analizy lekooporności i typowania fagowego) oraz genotypowych (ADSRRS-fingerprinting, RAPD-PCR oraz PFGE). Zastosowanie technik biologii molekularnej do analizy materiału genetycznego szczepów bakteryjnych odpowiedzialnych za czyraczność stwarza nowe możliwości diagnostyczne w tym schorzeniu. Przeprowadzono również nowatorskie badania nad wrażliwością omawianych szczepów gronkowca złocistego w stosunku do naturalnych peptydów antybakteryjnych pod kątem zastosowania ich jako alternatywnych metod terapeutycznych.

Czyraczność jest głęboką infekcją mieszków włosowych wywoływaną przez *Staphylococcus aureus*. Wystąpieniu choroby sprzyja uszkodzenie integralności skóry wskutek podrażnienia, otarcia, ucisku, nadmiernej potliwości, oparzenia czy stanu zapalnego. Częściej jednak czyraki powstają na uprzednio zdrowej skórze [1, 137]. O czyraczności przewlekłej mówi się wówczas, gdy doszło do 3 lub więcej wysiewów zmian skórnych utrzymujących się dłużej niż 3 miesiące [32]. Odrębny problem stanowi czyraczność rodzinna, którą rozpoznaje się wówczas, gdy zmiany skórne występują u co najmniej 2 członków rodziny. Czynnikiem etiologicznym mogą być zarówno własne szczepy gospodarza (zakażenie autogenne), jak i szczepy pochodzące od innych członków rodziny czy otoczenia. Zarazki rozprzestrzeniają się głównie drogą kropelkową, rzadziej przez zakażone powietrze, kurz, przedmioty.

Nawrotom czyraków sprzyjają różne czynniki ogólne ze strony gospodarza. Są to: otyłość, alkoholizm, złe odżywianie, zaburzenia hematologiczne (w tym nieprawidłowa czynność neutrofilów i niedokrwistość), hipogammaglobulinemia, immunosupresja

(leczenie kortykosteroidami i cytostatykami), zespół nabytego niedoboru odporności i cukrzyca [32, 41, 62, 86, 91].

Większość pacjentów z nawracającą czyracznością jest jednak ogólnie zdrowa, a przyczyną zmian może być samozakażenie i rozsiew wewnątrz rodziny [10]. W badanej grupie 48 chorych z czyracznością nawrotową tylko u dwóch stwierdzono choroby predysponujące do nawrotowych infekcji gronkowcowych: przewlekłą białaczkę szpikową i cukrzycę typu II. Pozostali pacjenci nie byli obciążeni żadnymi schorzeniami ogólnoustrojowymi. Byli to ludzie młodzi (średnia wieku 34 lata i 7 miesięcy), nie demonstrujący żadnych odchyśleń w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych. Obserwacja ta wskazuje na konieczność poszukiwania predyspozycji do nawracającej czyraczności w zaburzeniach immunologicznych na poziomie granicy skórno-naskórkowej, a nie ogólnoustrojowych jak dotychczas uważano.

Nosicielstwo gronkowca złocistego w jamie nosowo-gardłowej przytaczane w licznych publikacjach jako czynnik predysponujący do infekcji [11, 20, 104, 135] zostało stwierdzone u 60.8% badanych chorych. Jednakże 39.2% pacjentów z czyracznością nie było nosicielami tego patogenu, a mimo to manifestowało skłonność do nawrotowości zmian skórnych.

Wieloośrodkowe badania epidemiologiczne dowodzą związku między nosicielstwem a infekcjami gronkowcowymi w pewnych grupach pacjentów. Zakażenia te dotyczą przede wszystkim chorych przewlekle dializowanych, po zabiegach operacyjnych oraz z obniżoną odpornością [76, 156].

Kluytmans i wsp. przeprowadził kontrolowane badanie w grupie chorych poddawanych operacjom kardiochirurgicznym, u których doszło do zakażenia w obrębie rany pooperacyjnej. Sprawdzano nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w nosie oraz porównywano czy szczep wyizolowany z nosa i z rany pooperacyjnej należy do tej samej grupy fagowej. Identyczność fenotypową badanych szczepów uzyskano w 92% przypadków [76]. Wyniki te wskazują na konieczność badania nosicielstwa gronkowca złocistego u chorych poddawanych zabiegom chirurgicznym i przeprowadzenia eradykacji patogenu przed przystąpieniem do operacji.

Niewiele pisze się na temat związku nosicielstwa *Staphylococcus aureus* z epidemiologią i patogenezą gronkowcowych chorób skóry. W czyraczności i zapaleniu mieszków włosowych stwierdzono koincydencję nawrotowości zmian z nosicielstwem. Tulloch już 49 lat temu stwierdził na podstawie typowania fagowego, że ten sam szczep u danego pacjenta jest izolowany ze zmiany skórnej i jamy nosowo-gardłowej [147].

Leigh podaje, że w obrębie jednej rodziny możliwe jest wystąpienie kilku typów fagowych *Staphylococcus aureus* [83], podczas gdy Zimakoff i wsp. w badaniu przeprowadzonym na 6 rodzinach z problemem czyraczności rodzinnej dowiódł, że podczas dwuletniej obserwacji typy fagowe *Staphylococcus aureus* w obrębie rodziny były takie same [163]. W przedstawionych badaniach własnych u 45 chorych szczepy izolowane ze zmiany skórnej oraz nosa i/lub gardła u danego pacjenta prezentowały taki sam wzór oporności na antybiotyki. Jedynie u trzech chorych uzyskano rozbieżności w antybiogramach dla szczepów izolowanych z nosa i gardła (szczepy nr 75 i 77 oraz 35 i 42 a także 66 i 68). Nieco odmiennie przedstawiały się omawiane zależności w przypadku czyraczności rodzinnej. W większości rodzin szczepy odpowiedzialne za zmiany skórne u poszczególnych członków prezentowały różne fenotypy. Jedynie w obrębie jednej rodziny (szczepy 58, 59 i 60) zaobserwowano identyczny fenotyp odpowiedzialny za wykwity chorobowe u wszystkich członków rodziny. W 80% przypadków szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane od danego pacjenta ze zmiany skórnej i/lub gardła należały do tej samej grupy fagowej natomiast w 20% przypadków uzyskano szczepy prezentujące przynależność do różnych grup fagowych. Otrzymane rezultaty korespondują z obserwacją wysuniętą przez Leigh'a, wskazującą na zróżnicowanie szczepów izolowanych od poszczególnych pacjentów.

Większość analizowanych szczepów demonstrowała przynależność do II grupy fagowej co jest porównywalne z danymi z piśmiennictwa [83, 110, 139].

W literaturze podawane są różne modele leczenia nawracających infekcji gronkowcowych, niewielką jednak uwagę przywiązuje się do problemu kolonizacji rodzinnej i konieczności leczenia domowników w celu eliminacji potencjalnych źródeł zakażenia.

Zimakoff i wsp. propagowali leczenie czyraczności rodzinnej jedynie przy pomocy preparatów miejscowych, zalecając kąpiele z dodatkiem 4% chlorheksydyny i aplikację 1% chlorheksydyny w żelu do nosa w celu zwalczania nosicielstwa przez okres 3 tygodni [163]. Dodatkowo zalecali poprawę warunków higienicznych w otoczeniu pacjenta argumentując to spostrzeżeniem, że szczepy patogenne występują nie tylko u chorego, ale również w jego otoczeniu (na pościeli, ręcznikach, ubraniach). Taki schemat postępowania zastosowano u 6 rodzin (28 osób) z bardzo dobrym efektem klinicznym. W ciągu 2 lat obserwacji nie odnotowano nawrotów choroby mimo, że nosicielstwo *Staphylococcus aureus* w nosie stwierdzono ponownie w dominującej liczbie przypadków.

Większość autorów zaleca jednak terapię skojarzoną (miejscową i ogólną). Szarmach proponuje claforan i autoszczepionkę [140], Hoss zaleca kombinację cephaleksyny i rifampicyny [61], Hedstrom rekomenduje model terapii skojarzonej z użyciem kwasu fusydowego w maści donosowej i ogólnego podania flukloksacyliny [58], z kolei Levy jest zwolennikiem 30 dniowej kuracji 500 mg witaminy C [86]. Jako prewencję nawracających gronkowcowych chorób skóry Klempner proponuje trzymiesięczną kurację niskimi dawkami klindamycyny [74].

Najbardziej spektakularne efekty lecznicze obserwowano jednak po zastosowaniu skojarzonego leczenia rifampiciną (300 mg co 12 h) i klindamycyną (300 mg co 12 h) przez 10 tygodni [53]. Rifampicina należy do antybiotyków szerokospektralnych, jednak zbyt częste jej stosowanie prowadzi do szybkiego wytwarzania szczepów opornych. Zjawisko to jest obserwowane w sytuacjach, gdy rifampicina jest stosowana w monoterapii. Skojarzenie z innymi chemioterapeutykami, np. z klindamycyną pozwala na wyeliminowanie tego efektu.

Mechanizm działania rifampicyny polega na wiązaniu i inaktywacji DNA-zależnej bakteryjnej polimerazy RNA [126].

Na podstawie wieloletnich badań zaobserwowano, że rifampicina jest szczególnie efektywna w stosunku do *Staphylococcus aureus*, gdyż dobrze penetruje do wnętrza fagocytów w których ten drobnoustrój ma zdolność przeżywania w fazie utajenia. Stąd też antybiotyki, które nie mają możliwości przenikania do fagocytów (np. penicyliny) są mało skuteczne w infekcjach o etiologii gronkowcowej [122].

Klindamycyna natomiast wiąże się z podjednostką 50s rybosomu bakteryjnego hamując wczesne stadia syntezy białek bakteryjnych. Rifampicina wraz z klindamycyną są związkami lipofilnymi i osiągają wysokie stężenia wewnątrz fagocytów, dzięki czemu tak skutecznie działają na *Staphylococcus aureus*. Udowodniono, że 3 miesięczna kuracja niskimi dawkami klindamycyny (150mg/d) zabezpieczyła 82% badanych pacjentów przed nawrotami czyraków przez 3 miesiące po zakończeniu terapii. Nie zaobserwowano też żadnych niekorzystnych reakcji u chorych stosujących ten model terapii [74]. Oczywiście oporność bakterii na ten antybiotyk wyklucza możliwość zastosowania go w terapii. Należy podkreślić, że w ciągu ostatnich lat obserwuje się narastanie oporności szczepów gronkowca złocistego na antybiotyki [138]. W latach 1998-2001 zaobserwowano wśród szczepów izolowanych ze zmian skórnych narastanie oporności na erytromycynę i klindamycynę od 4.7% w 1998, poprzez 6% w 1999, 8% w 2000 aż po 11% w 2001 roku [108]. Wynika to z nadużywania antybiotyków przez lekarzy różnych

specjalności w ciągu ostatnich lat, a tym samym indukowania szczepów opornych. Zatem przed zastosowaniem kuracji antybiotykowej wskazane jest wykonanie badania bakteriologicznego treści ze zmiany i włączenie terapii celowanej.

Wśród analizowanych szczepów gronkowca złocistego uzyskanych od chorych z czyracznością nawrotową było 18.5% opornych na erytromycynę i klindamycynę w przeciwieństwie do grupy kontrolnej w której w ogóle nie obserwowano szczepów opornych na klindamycynę, natomiast oporność na erytromycynę wynosiła 33.3%. Badania przeprowadzone na mniejszej grupie chorych z czyracznością (29 osób) w latach 1998-2000 dowodzą istnienia mniejszej liczby szczepów opornych na analizowane antybiotyki: 7.1% opornych na erytromycynę i 4.7% na klindamycynę [109].

Istnieją doniesienia na temat korzystnego wpływu witaminy C w dawkach 0.5 do 1.0g na dobę w leczeniu czyraczności. Wpływa ona nie tylko na poprawę funkcji neutrofilów ale również na przebieg choroby [86].

Natura defektu funkcji neutrofilów u pacjentów z czyracznością nie jest do końca poznana i udowodniona. Działanie witaminy C na fagocytozę i chemotaksję neutrofilów związane jest najprawdopodobniej z jej efektem antyoksydacyjnym [85].

Inną interesującą obserwacją jest korzystny wpływ pentoksyfiliny na leczenie przewlekłej czyraczności. Chociaż nie wywiera ona bezpośredniego działania antybakteryjnego w stosunku do *Staphylococcus aureus*, wpływa na wzrost aktywności fagocytarnej neutrofilów. Opisano interesujący przypadek kliniczny ustąpienia zmian skórnych w przebiegu czyraczności po zastosowaniu pentoksyfiliny w dawce 400mg trzy razy na dobę przez okres 6 miesięcy u chorego z cukrzycą typu II i niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Pacjent ten był poprzednio wielokrotnie leczony antybiotykami z grupy penicylin i cefalosporyn bez większego efektu klinicznego [7].

Istnieją też doniesienia dowodzące związku między czyracznością a niskim poziomem żelaza w surowicy krwi [29]. Wiadomo, że niedobór żelaza sprzyja większej podatności na infekcje, prawdopodobnym wydaje się więc iż może też predysponować do czyraczności. Weijmer i wsp. dowiedli remisji zmian skórnych u pacjentów z czyracznością po suplementacji żelazem [150]. W badaniach własnych nie stwierdzono niedoboru żelaza u analizowanych chorych.

Nadal otwarty pozostaje problem postępowania z pacjentami, u których mimo kilkakrotnego zastosowania antybiotykoterapii dochodzi do nawrotów choroby.

Przedstawione powyżej strategie mające na celu prewencję nawrotów czyraczności, poczynawszy od poprawy warunków higienicznych poprzez miejscową i ogólną

antybiotykoterapię nie stanowią złotego środka u wszystkich chorych. Eliminują one objawy chorobowe i nosicielstwo patogenu tylko na określony czas, natomiast nawrót nosicielstwa jest obserwowany średnio po miesiącu od zakończenia terapii [155]. Skomplikowana patogenezą omawianego schorzenia skłania więc do poszukiwania nowych technik diagnostycznych pozwalających udzielić odpowiedzi na pytanie czy to nie wybitna patogenność konkretnych szczepów gronkowca złocistego jest przyczyną nawrotowości zmian u poszczególnych pacjentów.

W celu dokładnej analizy materiału genetycznego badanych szczepów wykorzystano trzy techniki PCR: ADSRRS-fingerprinting, RAPD-PCR i PFGE. Technika PFGE uznana jest za „złoty standard” w typowaniu izolatów bakteryjnych jednakże istnieje kilka obiektywnych przyczyn, dla których nie jest możliwe jej wykorzystanie w każdych warunkach. Jest metodą znacznie bardziej czasochłonną i kosztowną niż omawiana technika fingerprinting, dodatkowo zaś może być przeprowadzona tylko w laboratoriach referencyjnych przez przeszkolony do tego celu personel.

W prezentowanej pracy po raz pierwszy zastosowano technikę ADSRRS-fingerprinting do typowania szczepów *Staphylococcus aureus* (technika ta nie wymaga wcześniejszej znajomości analizowanej sekwencji, wyniki mogą być z łatwością analizowane na żelu poliakrylamidowym wybarwionym bromkiem etydydny zaś jeden zestaw adaptorów i enzymów wystarcza do analizy DNA szeregu gatunków bakterii; ponadto jest efektywną, szybką i niedrogą metodą molekularną typowania izolatów bakteryjnych) [96]. Wyodrębniła ona 31 genotypów (od A do AF) z puli 81 szczepów co dowodzi dużego zróżnicowania wśród badanych szczepów i jednocześnie nakazuje poszukiwania innych przyczyn nawrotowości omawianego schorzenia niż patogenność konkretnego szczepu. Technika RAPD-PCR zastosowana do 40 szczepów potwierdziła większość wyników uzyskanych przy pomocy metody fingerprinting. Wyniki typowania PFGE wybranych izolatów o znanym genotypie RAPD-PCR i ADSRRS-fingerprinting różniły się tylko w jednym przypadku. Ciekawym spostrzeżeniem wydaje się fakt, że w 57.8% przypadków szczepy izolowane ze zmiany skórnej oraz nosa i/lub gardła prezentowały ten sam genotyp podczas gdy w 42.2% przypadków różniły się one pod względem genotypu. Wśród analizowanych 9 rodzin z czyracnością rodzinną tylko w 2 rodzinach szczepy izolowane ze zmian skórnych poszczególnych członków należały do tego samego klonu (szczepy 58 i 59 (genotyp E) w rodzinie I oraz szczepy 54 i 55 (genotyp R) w rodzinie II). W pozostałych rodzinach nie stwierdzono zależności epidemiologicznej między zmianami skórnymi u domowników a wywołującym je

szczepem *Staphylococcus aureus*. Wydaje się więc, że większe znaczenie ma osobnicza podatność na infekcje gronkowcowe niż patogenność konkretnego szczepu.

Różnice między fenotypem oporności na antybiotyki a genotypem wynikają z mechanizmów oporności gronkowca złocistego. Oporność tych bakterii na antybiotyki jest kodowana chromosomalnie lub wiąże się z obecnością w komórce plazmidu niosącego geny oporności. W związku z tym lekooporność szczepów gronkowca nie jest jednorodna. Pewne plazmidy mogą być nabywane, inne spontanicznie tracone (np. podczas długiego przechowywania szczepów), co wpływa na zmienność profilu oporności oraz obraz elektroforetyczny w technikach PCR. Przykładem oporności warunkowanych przez geny plazmidu jest mechanizm oporności na penicylinazy, za który odpowiadają tzw. plazmidy penicylinazowe klasy II, zawierające gen *blaZ* oraz transpozony w obrębie plazmidów. Innym przykładem oporności gronkowców związanej z transpozonomi jest mechanizm oporności na aminoglikozydy [131].

W badaniach własnych oceniano przede wszystkim właściwe genomowe DNA bakterii. Możliwe jest więc, że różnice oporności związane są z wystąpieniem transpozonu w genomie lub tylko w ruchomych strukturach plazmidów.

Należy również pamiętać, że genotyp danego szczepu odpowiedzialnego za zmiany skórne u jednej osoby może zmieniać się na skutek genomowych rearanżacji i rozprzestrzeniania np. w obrębie rodziny dając nieco inny wzór na żelu elektroforetycznym. Możliwa jest również sytuacja, że osoby podatne na nosicielstwo *Staphylococcus aureus* nabywają go innymi drogami niż przez kontakt z członkami rodziny, co sprawia, że bakterie izolowane od chorego różnią się fenotypowo i genotypowo od patogenów izolowanych od domowników [21]. Udowodniono ponadto, że u pacjentów cierpiących z powodu przewlekłych chorób infekcyjnych często dochodzi do zmian w genomie gronkowca złocistego na skutek delekcji, konwersji lub mobilizacji fagów [51].

Badanie porównujące większą grupę szczepów gronkowca złocistego trzema metodami, ADSRRS-fingerprinting, RAPD-PCR i PFGE, pozwoli na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków co do dyskryminacji i zgodności metod opartych na PCR z metodą analizy restrykcyjnej całego genomu jaką jest PFGE. Dotychczasowe wyniki wskazują na przydatność RAPD-PCR i ADSRRS-fingerprinting do badań epidemiologicznych *Staphylococcus aureus*. Ta ostatnia metoda może być bardziej atrakcyjna w przypadku porównywania wyników typowania otrzymanych w różnych laboratoriach i w różnych odstępach czasowych. Dodatkowo niewielkie koszty jej

stosowania i porównywalność wyników uzyskanych innymi metodami wysuwają ją na czołową pozycję w typowaniu izolatów bakteryjnych.

Uzyskane w badaniach własnych wyniki świadczące o dużej różnorodności genotypowej patogennych szczepów gronkowca złocistego korespondują z rezultatami typowania molekularnego szczepów MRSA techniką PFGE, które spośród 14 izolatów MRSA wyodrębniły 6 różnych genotypów [66].

Inne badania przeprowadzone na grupie szczepów MRSA opornych i wrażliwych na gentamycynę przy pomocy techniki PFGE również dowiodło dużego polimorfizmu genetycznego wśród szczepów gronkowcowych. Uzyskano aż 67 genotypów w grupie 266 szczepów opornych na gentamycynę i 18 genotypów w grupie 238 wrażliwych na ten antybiotyk [93]. Niezwykle interesującą i ważną obserwacją wynikającą z tych badań jest bardzo duże zróżnicowanie genetyczne szczepów opornych na gentamycynę, wśród których wszystkie były chorobotwórcze w przeciwieństwie do szczepów wrażliwych na gentamycynę prezentujących wyraźnie mniejszy polimorfizm.

Zmienność profilu oporności szczepów gronkowcowych na antybiotyki ciągle ewoluuje przyczyniając się do rozprzestrzeniania się nowych klonów bakteryjnych [118].

Ostatnie badanie dotyczące czyraczności wywoływanej przez szczepy MRSA na południowym zachodzie Alaski dowiodło, iż większość szczepów izolowanych z czyraka i nosa odpowiedzialnych za infekcję wykazywała genetyczne podobieństwo w PFGE w odróżnieniu od dużo większej różnorodności szczepów MSSA (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*) izolowanych od pacjentów z gronkowcowymi chorobami skóry. W pierwszej grupie spośród 79 szczepów wyodrębniono 2 dominujące profile genetyczne wśród których wyselekcjonowano 4 podgrupy podczas gdy w drugiej grupie złożonej z 78 szczepów stwierdzono 26 różnych genotypów. Badanie kolonizacji rodzinnej nie wykazało przenoszenia się szczepów z osoby na osobę wśród domowników pacjentów z czyracznością MRSA, co wykazano również w większości przypadków w badaniach własnych. Duża jednorodność szczepów patogennych MRSA w przytaczanej pracy związana była z prawdopodobnym źródłem infekcji, którym były sauny, gdzie zidentyfikowano analogiczne szczepy bakteryjne jak w grupie badanej. Pacjenci objęci dochodzeniem epidemiologicznym dość często korzystali z sauny, a lokalizacja wykwitów na pośladkach i udach w tej grupie chorych również przemawia za sauną jako miejscem nabywania infekcji. Dla kontrastu w grupie kontrolnej zmiany skórne miały charakter rozsiany i nie wykazywały predylekcji do konkretnych okolic ciała [8].

W prezentowanej pracy do identyfikacji materiału genetycznego szczepów bakteryjnych wykorzystano trzy metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

PCR jest szybką metodą diagnostyczną – wystarczy kilka godzin by powielić badany materiał genetyczny i go zanalizować. Do analizy potrzebna jest niewielka ilość materiału, a reakcja jest łatwa do przeprowadzenia. Po optymalizacji warunków reakcji zapewniającej jej powtarzalność i czułość PCR staje się niezastąpioną techniką diagnostyczną w laboratorium [100].

Metoda ta ma też jednak wady. Wysoka czułość PCR stwarza zagrożenie powielenia materiału genetycznego będącego zanieczyszczeniem (DNA przeniesione do mieszaniny reakcyjnej np. poprzez zakażone mikropipety, czy niesterylne próbki). W diagnostyce medycznej może to prowadzić do takich pomyłek jak np. stwierdzenie obecności wirusa HIV we krwi niezakażonego pacjenta, czy też do stwierdzenia monoklinalności przemawiającej za nowotworem w chorobach nienowotworowych. Aby temu zapobiec laboratorium w którym przeprowadza się łańcuchową reakcję polimerazy musi mieć kilka pomieszczeń (jedno do izolacji DNA, inne do przeprowadzenia reakcji PCR, kolejne do analizy jej produktów), a pracownicy muszą dbać o sterylność sprzętu i odzieży ochronnej [116].

Ważnym zjawiskiem jest możliwość uzyskania fałszywie negatywnych wyników. Decydująca jest ilość matryc i ewentualne występowanie inhibitorów reakcji. Do najistotniejszych zanieczyszczeń należą SDS, EDTA, heparyna (co ma szczególne znaczenie przy badaniu krwi), DMSO, fenol i sole. Ujemnie na PCR może też wpłynąć zbyt duża liczba matryc – w tej sytuacji sama matryca może stać się starterem i doprowadzić do powstania kilku produktów PCR. Zbyt mała liczba matryc prowadzi do zahamowania reakcji PCR. Do degradacji matrycowego DNA dochodzi nawet podczas prawidłowego przechowywania próbek – z czasem otrzymywany produkt będzie krótszy lub w ogóle nie wystąpi. Ważne też jest, aby startery nie były do siebie komplementarne, gdyż będą tworzyć dimery, co obniży wydajność reakcji. Jeśli temperatura wiązania starterów będzie zbyt niska, to powstaną produkty nieswoiste, co utrudni analizę PCR. Niezwykle istotny jest też wybór takiego układu restrykcyjnego, który cechuje się największym potencjałem różnicującym – daje nie za dużo ale i nie za mało prążków na żelu elektroforetycznym. Gdy amplikonów (produktów PCR) jest zbyt mało nie jest możliwe precyzyjne zróżnicowanie szczepu, natomiast gdy jest ich zbyt dużo to trudna jest interpretacja wyniku [130, 153].

Pomimo tych wad PCR jest metodą chętnie stosowaną w diagnostyce izolatów bakteryjnych. Istnieje bardzo wiele różnych metod opartych na PCR stosowanych w analizie *Staphylococcus aureus*. Oprócz czułości i swoistości techniki należy rozpatrywać możliwości diagnostyczne danego laboratorium, ponieważ rzadko badacz nie jest ograniczony finansowo i ma możliwość wyboru dowolnej spośród wszystkich dostępnych na świecie metod. Ważne jest też doświadczenie badacza. Czasem lepszym narzędziem badawczym jest technika o niższej czułości i swoistości, ale wykonywana wielokrotnie prawidłowo. Porównywalność wyników uzyskanych przy pomocy trzech różnych technik PCR w badaniach własnych świadczy o prawidłowym przeprowadzeniu eksperymentów.

Dysponując dobrze zdefiniowanym fenotypowo i genotypowo materiałem bakteryjnym podjęto się w badaniach własnych oceny wrażliwości różnych szczepów *Staphylococcus aureus* w stosunku do naturalnych peptydów antybakteryjnych.

Peptydy antybakteryjne są integralną składową odporności wrodzonej i wywierają silny efekt przeciwbakteryjny, przeciwwirusowy i przeciwgrzybiczy. Ponadto modyfikują miejscową odpowiedź zapalną i aktywują mechanizmy odporności komórkowej i humoralnej. Katelicydyny i defensyny stanowią dwie największe rodziny peptydów antybakteryjnych obecnych w skórze, chociaż inne peptydy skórne takie jak inhibitory proteinaz, chemokiny i neuropeptydy również demonstrują aktywność przeciwbakteryjną. Podsumowując, wszystkie wymienione peptydy antybakteryjne pełnią niezwykle istotną rolę w obronie miejscowej i patogenezie chorób skóry [15].

W miejscu przerwania ciągłości skóry na skutek urazu czy też w miejscu infekcji obserwowany jest znamieny wzrost ekspresji peptydów antybakteryjnych w związku ze zwiększoną ich syntezą przez keratynocyty i uwalnianiem przez napływające do miejsca infekcji neutrofile. Konstytutywna i indukowana ekspresja zarówno ludzkich katelicydyn (hCAP18/LL-37) jak i β -defensyn (hBD-1, hBD-2 i hBD-3) jest obserwowana w naskórkowych keratynocytach [35, 43]. Podczas gdy katelicydyny i defensyny są najlepiej znane z właściwości antybakteryjnych, wiele innych peptydów również demonstruje aktywność bakteriobójczą (tab. 4).

Narastanie oporności bakterii na konwencjonalne antybiotyki stanowi poważny problem współczesnej medycyny i skłania do poszukiwania nowych metod terapeutycznych wykorzystujących możliwości obronne ludzkiego ustroju. Z klinicznego punktu widzenia cele podjęte w badaniach własnych mają kilka implikacji. W ostatnich latach zwrócono uwagę, iż nadużywanie środków dezynfekcyjnych indukuje powstawanie

coraz większej liczby szczepów opornych i rozwijanie mechanizmów oporności krzyżowej na środki antyseptyczne i antybiotyki [17]. Biorąc pod uwagę fakt, że pacjenci cierpiący na czyraczność przewlekłą często są poddawani antybiotykoterapii nasuwa się pytanie czy niekontrolowane stosowanie antybiotyków i indukcja szczepów opornych jest związana z krzyżową opornością na peptydy antybakteryjne w tej grupie chorych. W badaniach własnych nie znaleziono dowodu na rozwój oporności na peptydy antybakteryjne w relacji do oporności w stosunku do konwencjonalnych antybiotyków. Zarówno szczepy wrażliwe na wszystkie testowane antybiotyki jak i oporne na 3 i 4 z nich prezentowały wysoką wrażliwość na bakteriobójcze działanie LL-37 i hBD-3. Wynika to najprawdopodobniej z całkowicie innego mechanizmu działania omawianych grup związków antybakteryjnych. Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki korespondują ze spostrzeżeniem, że *Pseudomonas aeruginosa* zaadaptowany do chlorku benzalkonium prezentuje oporność na inne błonowo aktywne środki, ale nie tradycyjne antybiotyki [88].

Duża aktywność bakteriobójcza LL-37 i hBD3 w stosunku do *Staphylococcus aureus* wysuwa je na czołową pozycję w prowadzeniu dalszych badań mających na celu opracowanie ich jako miejscowych środków terapeutycznych w gronkowcowych chorobach skóry.

Niezwykłe interesującą obserwacją uzyskaną w badaniach własnych jest potencjalizujący wpływ erytromycyny na antybakteryjną aktywność LL-37. Wydaje się, że wynika to z różnych mechanizmów działania omawianych substancji prowadzących w rezultacie do efektu synergistycznego. W przeciwieństwie do stymulacji niszczenia błony komórkowej przez LL- 37 [30, 38], erytromycyna działa na podjednostkę 50S rybosomu hamując translację poprzez blokowanie reakcji peptydylotransferazy lub etap translokacji [25].

Podobny efekt synergistyczny zaobserwowano między makrolidami i innymi kationowymi peptydami antybakteryjnymi [47]. *Staphylococcus aureus* stymuluje wzrost poziomu LL-37 poprzez napływ i degranulację neutrofilów oraz aktywację keratynocytów w warunkach stanu zapalnego *in vivo*. Hipoteza wysunięta na podstawie wyników własnych sugeruje, że nawet izolaty gronkowca złocistego oporne na erytromycynę *In vitro* mogą być wrażliwe na ten antybiotyk *in vivo*. Jest to związane z bardzo wysokim poziomem LL-37 w miejscu infekcji. Można to udowodnić poprzez zastosowanie miejscowe erytromycyny na ognisko zakażenia i obserwację efektu terapeutycznego. Poprawa kliniczna przemawiałaby za słusznością postawionej hipotezy.

Ostatnią obserwacją wynikającą z badań własnych jest zmniejszona aktywność bakteriobójcza LL-37 w stosunku do analizowanych szczepów *Staphylococcus aureus* w obecności lizozymu. Podczas gdy LL-37 wchodzi w interakcje z licznymi składowymi ścianą komórkowej gronkowca złocistego, takimi jak kwas teichojowy i peptydoglikany oraz błoną komórkową bakterii i grupami fosfolipidowymi, lizozym aktywuje grupę endogennych enzymów autolitycznych ścianą komórkowej bakterii (przede wszystkim muramidazy, które w warunkach fizjologicznych kontrolują normalne podziały komórek) prowadząc do hydrolizy i autolizy ścian komórkowej bakterii [48].

U bakterii Gram(+) głównym regulatorem aktywności autolizyn jest kwas lipoteichojowy (LTA) [49]. Wśród badanych szczepów większość była oporna na lizozym (prawdopodobnie z powodu obecności grup O – acetylowych w peptydoglikanie i/lub obecności wolnych aminokwasów na cukrach) [68]. Mechanizm odpowiedzialny za hamowanie aktywności LL-37 przez lizozym nie jest dotychczas poznany. Wiadomo jednak, że te dwa peptydy nie wiążą się ze sobą, co sprawdzono przy pomocy techniki western-blot (dane nie prezentowane w badaniach własnych). Uzyskane wyniki korespondują z obserwacją świadczącą o braku synergizmu między czterema klasami strukturalnymi peptydów antybakteryjnych (β -kartkami, α -helisami, przestrzennymi i liniowymi) a lizozymem w stosunku do metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* [59].

Zróznicowana ekspresja peptydów antybakteryjnych wydaje się odgrywać dużą rolę w podatności pacjentów z przewlekłymi zapalnymi chorobami skóry na infekcje bakteryjne. Dla przykładu LL-37 jest produkowany w zwiększonych ilościach w ludzkich keratynocytach w łuszczycy, toczniu rumieniowatym i kontaktowym zapaleniu skóry [43]. W keratynocytach ze zmian łuszczycowych są również nadmiernie syntetyzowane hBD-2 i hBD-3 [55, 105].

Zwiększona ekspresja peptydów antybakteryjnych w łuszczycy koreluje z małą podatnością zmian skórnych w tej chorobie na infekcje bakteryjne. Diametralnie różna sytuacja jest obserwowana u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry u których obniżony poziom LL-37 i hBD-2 sprzyja częstym infekcjom bakteryjnym i wirusowym [111]. Poziom LL-37 jest również podwyższony w zmianach zapalnych w rumieniu toksycznym noworodków [94] oraz brodawkach zwykłych i kłykcinach kończystych [24]. Dowiedziono również, że bardzo wysoki poziom hBD-2 jest obecny w zmianach skórnych o charakterze folliculitis wywoływanych przez *Staphylococcus aureus* [112].

Przytoczone badania dowodzą dużej roli protekcyjnej peptydów antybakteryjnych, będących integralną składową odporności wrodzonej, na choroby infekcyjne skóry.

Jest to pierwsza praca przedstawiająca dokładną analizę szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością przewlekłą w populacji polskiej. Została ona wykonana w oparciu o analizę lekooporności, typowanie fagowe i diagnostykę molekularną, natomiast seria eksperymentów dotyczących wrażliwości omawianych szczepów na peptydy antybakteryjne ma charakter całkowicie nowatorski, a uzyskane wyniki pozwalają na prowadzenie dalszych badań mających na celu opracowanie nowych metod terapeutycznych skutecznych w stosunku do patogenów bakteryjnych.

6. Wnioski

1. W większości przypadków stwierdzono związek między nosicielstwem *Staphylococcus aureus* w jamie nosowo-gardłowej a infekcją.
2. Nie wyodrębniono specyficznego genotypu odpowiedzialnego za czyraczność nawrotową.
3. W obrębie rodzin wystąpiły przypadki identyczności szczepów, ale zaobserwowano też przypadki rozbieżności genotypów, co może świadczyć o nabyciu szczepów innymi drogami niż przez kontakt z rodziną.
4. Naturalne peptydy antybakteryjne wydają się interesującą alternatywą dla konwencjonalnej antybiotykoterapii.
5. Oporność na antybiotyki nie koreluje z opornością w stosunku do LL-37 i hBD3 (nawet szczepy odporne na więcej niż 3 testowane antybiotyki wykazywały dużą wrażliwość na omawiane peptydy).
6. Uzyskane wyniki dają możliwość opracowania nowych metod terapeutycznych skutecznych w stosunku do patogenów bakteryjnych.

7. Streszczenie

Czyraczność wywoływana przez *Staphylococcus aureus* jest schorzeniem stwarzającym wiele trudności terapeutycznych nie tylko ze względu na swój przewlekły i nawrotowy przebieg, ale również narastającą oporność drobnoustrojów na najczęściej stosowane w tym schorzeniu leki przeciwbakteryjne. Koniecznym wydaje się poszukiwanie nowych skutecznych, pozbawionych działań niepożądanych metod terapeutycznych. Celem pracy była identyfikacja fenotypowa i genotypowa szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową oraz poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych opartych na właściwościach naturalnych peptydów antybakteryjnych.

Od każdego chorego pobierano wymaz ze zmiany skórnej, nosa i gardła. Identyfikacji gronkowca złocistego dokonano na podstawie morfologii kolonii i rodzaju hemolizy, preparatu barwionego metodą Grama, produkcji katalazy i koagulazy oraz rozkładu mannitolu w warunkach tlenowych i beztlenowych. Następnie określono lekooporność badanych szczepów metodą dyfuzyjno-krażkową i przeprowadzono typowanie bakteriofagowe celem określenia przynależności szczepów do grup fagowych. Kolejnym etapem badań była analiza szczepów *Staphylococcus aureus* przy pomocy technik PCR (ADSRRS-fingerprinting, RAPD i PFGE) oraz ocena wrażliwości poszczególnych genotypów na naturalne peptydy antybakteryjne (LL-37, hBD3, laktoferrynę i lizozym) przy pomocy metody radiodyfuzji, jednostek tworzących kolonie i frakcjonowanych stężeń hamujących.

Wśród badanych 81 szczepów opornych na penicylinę było 88.9%, klindamycynę 18.5%, erytromycynę 18.5% zaś doksycyklinę 13.5%. Wszystkie szczepy były wrażliwe na oksacylinę i ciprofloksacynę. Stwierdzono dominację II grupy fagowej obecną w 51% badanej puli izolatów. Na podstawie badań genetycznych wyodrębniono 31 genotypów (od A do AF). Wszystkie analizowane szczepy były wrażliwe na LL-37 i hBD3 natomiast wykazywały oporność na laktoferrynę. Tylko 3 szczepy wykazywały wrażliwość w stosunku do lizozymu. Nie znaleziono korelacji między wrażliwością na antybiotyki

i LL-37, zaobserwowano natomiast zmniejszenie aktywności bakteriobójczej LL-37 w obecności lizozymu (wzrost MIC dla LL-37 z 8-32 mg/L do 32-128 mg/L po dodaniu lizozymu). Stwierdzono ponadto efekt synergistyczny między erytromycyną a LL-37. Doksycyklina i klindamycyna natomiast nie zwiększały aktywności bakteriobójczej LL-37.

Podsumowując można stwierdzić, że nie ma specyficznego genotypu odpowiedzialnego za czynność nawrotową. Wrażliwość wszystkich analizowanych szczepów na LL-37 i hBD3 stanowi interesującą alternatywą dla konwencjonalnej antybiotykoterapii.

8. Summary

Furunculosis caused by *Staphylococcus aureus* presents a difficult therapeutic problem not only because of chronic and recurrent course but also increasing resistance of microorganisms against the most frequently used antibacterial agents. It is necessary to look for a new effective therapeutic methods free of undesirable effects of antibiotics.

The aim of the investigation was phenotypic and genotypic identification of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the patients with recurrent furunculosis and looking for new therapeutic methods based on antibacterial activity of natural antimicrobial peptides.

The swabs obtained from the each patient from the skin lesions, nose and throat were studied. Identification of *Staphylococcus aureus* was based on colony morphology and the kind of hemolysis, Gram positive staining, production of catalase and coagulase and the decomposition of mannitol in aerobic and anaerobic conditions. Then the susceptibility of investigated strains to antibiotics with diffuse-disk assay and the phage typing were established. The next step was the analysis of *Staphylococcus aureus* strains by PCR techniques (ADSRRS-fingerprinting, RAPD and PFGE) as well as investigation of susceptibility of subsequent genotypes to natural antimicrobial peptides (LL-37, hBD3, laktoferrin and lysozyme) by radial diffusion, colony forming units and fractional inhibitory concentration assays.

Among investigated 81 strains we have found 89.9% resistant to penicillin, 18.5% to erythromycin, 18.5% to clindamycin and 13.5% to doxycyclin respectively. All strains were susceptible to oxacillin and ciprofloxacin. Domination of II phage group was observed in 51% of investigated strains. PCR patterns for 81 isolates found 31 unique profiles (from A to AF). All strains were susceptible to LL-37 and hBD3 but resistant to lactoferrin. Only 3 strains demonstrated susceptibility to lysozyme. We did not identify any correlation between susceptibility to antibiotics and LL-37. We detected that lysozyme decreased the antimicrobial activity of LL-37 when have been used together (increase of MIC of LL-37 from 8-32mg/L to 32-128mg/L after addition of lysozyme).

In the presence of antibiotics, only erythromycin potentiated the bactericidal activity of LL-37. We did not observe any synergy between LL-37 and doxycycline or clindamycin.

To sum up I would say that there is no specific genotype which is responsible for recurrent furunculosis and susceptibility of all investigated strains to LL-37 and hBD3 makes them an interesting alternative in relation to conventional antibiotic therapy.

9. Piśmiennictwo

1. Adams B.B. Dermatologic disorders of the athlete. *Sports Med* 2002; 32: 309 – 21.
2. Agerberth. B., Charo, J., Werr, J. *et al.* The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000; 96: 3086-93.
3. Agerberth, B., Grunewald, J., Castanos – Velez, E. *et al.* Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 160: 283-90.
4. Allaker R.P., Zihni C., Kapas S. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23: 289-93.
5. Arbuthnott J.P., Coleman D.C., de Azavedo J.S. Staphylococcal toxins in human disease. *J Appl Bacteriol* 1990; 69 (supl):1013-75.
6. Arvidson S., Holme T., Lidholm B. The formation of extracellular proteolytic enzymes by *Staphylococcus aureus*. *Acta Path Microbiol Scand* 1972; 80: 835-844.
7. Asher V., Wahba-Yahav. Intractable chronic furunculosis: prevention of recurrences with pentoxifilline. *Acta Derm Venereol* 1992, 72: 461-2.
8. Baggett H.C., Hennessy T.W., Rudolph K. *et al.* Community - onset methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Pantone – Valentine Leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Invest Dermatol* 2004; 119: 1565-73.
9. Bals, R., Wang, X., Wu, Z., *et al.* Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998; 102: 874-80.
10. Ben-Amitai D. Ashkenazi S. Common bacterial skin infections in childhood. *Pediatric Annals* 1993; 22: 225-33.
11. Berger T.G. Treatment of bacterial, fungal and parasitic infections in the HIV-infected host. *Sem Dermatol* 1985; 121: 873.
12. Blankenvoorde M.F., van't Hof W., Walgreen-Weterings E. *et al.* Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem* 1998; 379: 1371-5.
13. Boden M.K., Flock J.I. Fibrinogen-binding proteins methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1989; 57: 2358-63.
14. Boman H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Internal Med* 2003; 254: 197-215.

15. Braff M.H., Bardan A., Nizet V., Gallo R.L. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 9-13.
16. Branger C., Goullet P., Boutonnier A., Fournier J.M. Correlation between esterase electrophoretic types and capsular polysaccharide types 5 and 8 among methicillin – susceptible and methicillin – resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 150-1.
17. Braoudaki, M., Hilton, A.C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents, *J Clin Microb* 2004, 42: 73-8.
18. Caccavo D., Pellegrino M., Altamura M. *et al.* Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 403-17.
19. Cates K.L., Quie P.G. Neutrophil chemotaxis in patients with *Staphylococcus aureus* furunculosis. *Infect Immun* 1979; 26: 1004-8.
20. Chiller K., Selkin B.A., Murakawa G.J. Skin mikroflora and bacterial infections of the skin. *J Invest Dermatol* 2001; 6 (3): 170-4.
21. Claus H, Cuny B, Passemann B *et al.* A database system for fragment patterns of genomic DNA of *Staphylococcus aureus*. *Zbl Bacteriol* 1998; 287: 105-16.
22. Cole A.M., Ganz T., Liese A.M. *et al.* Cutting edge: IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* 2001a; 167: 623-7.
23. Cole A.M., Shi J., Ceccarelli A. *et al.* Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. *Blood* 2001; 97: 297-304.
24. Conner K., Nern K., Rudisill J. *i wsp.* The antimicrobial peptide LL-37 is expressed by keratinocytes in condyloma acuminatum and verruca vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2002, 47: 347-50.
25. Contreras, A., Vasquez, D. Cooperative and antagonistic interactions of peptidyl-tRNA and antibiotics with bacterial ribosomes. *Eur J Bioch* 1977, 74: 539-47.
26. Csukas Z., Rozgonyi F., Toro K., Sotonyi P., Jancovics I. Detection and toxin production of *Staphylococcus aureus* in sudden infant death cases in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2001; 48: 129-41.
27. Cumberbatch M., Dearman R.J., Uribe-Luna S. *et al.* Regulation of epidermal Langerhans cell migration by lactoferrin. *Immunology* 2000; 100: 21-8.
28. Cutuli M., Cristiani S., Lipton J.M. *et al.* Antimicrobial effects of alpha- MSH peptides. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 233-9.
29. Dahl M.V. Strategies for management of recurrent furunculosis. *South Med. J* 1987, 80: 352-6.
30. Dathe, M., Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Acta Bioch Biophys* 1999, 1462: 71-87.

31. De Lencastre H., Jonge B.L., Matthews P.R., Tomasz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 7-24.
32. Demircay Z., Eksioglu – Demiralp E., Ergun T., Akoglu T. Phagocytosis and oxidative burst by neutrophils in patients with recurrent furunculosis. *Br J Dermatol* 1998; 138, 1036-8.
33. Domachowske J.B., Dyer K.D., Adams A.G. *et al.* Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A- family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res* 1998a; 26: 3358-63.
34. Domachowske J.B., Dyer K.D., Bonville C.A. *et al.* Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1998b; 177: 1458-64.
35. Dorschner, R.A., Pestonjamasp, V.K., Tamakuwala, S. *et al.* Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 91-7.
36. Duckworth G.J., Jordens J.Z. Adherence and survival properties of an epidemic Methicillin- resistant strain of *Staphylococcus aureus* compared with those of Methicillin-sensitive strains *J Med Microbiol* 1990; 32: 195-200.
37. Duckworth G.J., Oppenheim B.A. Enterotoxin production in epidemic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 1986; 1: 565-6.
38. Epand, R.M., Vogel, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Acta Biochimica and Biophysiological* 1999; 1462: 11-28.
39. Firth N., Skurray R.A. Mobile elements in the evolution and spread of multiple-drug resistance in staphylococci. *Drug Resistance Updates* 1998; 1: 49-58.
40. Fleisher B. The staphylococcal enterotoxins as prototype “superantigens” [w] *Staphylococci and staphylococcal infection*. [red] Mollby R., Flock J.I., Nord C.E., Christensson B. [wyd] Gustav Fisher Verlag. 1994; 325-327.
41. Forte W.C., Noyoya A.M., de Carvalho Junior F.F., Bruno S. Repeated furunculosis in adult male with abnormal neutrophil activity. *Allergol Immunopathol* 2000; 28: 328-31.
42. Foster T.J. Plazmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev* 1983; 47: 361-409.
43. Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G.. *et al.* The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997; 272: 15258-63.
44. Gallo R.L., Huttner K.M. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 739-43.
45. Gallo R.L., Ono M., Povsic T. *et al.* Syndecans, cell surface heparin sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11035-9.
46. Geha D.J., Uhl J.R., Gustafiero C.A., Persing D.H. Multiplex PCR for identification of Methicillin Resistant *Staphylococci* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1768-72.

47. Giacometti, A., Cirioni, O., Del Prete, M.S. *et al.* Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria. *Peptides* 2000, 21: 1155-60.
48. Ginsburg I. Bactericidal cationic peptides can also function as bacteriolysis-inducing agents mimicking beta-lactam antibiotics?; it is enigmatic why this concept is consistently disregarded. *Medical Hypotheses* 2004, 62, 367-74.
49. Ginsburg, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases* 2002, 2: 171-9.
50. Glaser R., Harder J., Bartels J. *et al.* Psoriasin (S100a7) is a major and potent *E. coli*-selective antimicrobial protein of healthy human skin. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 768.
51. Goerke Ch., Papenberg S.M., Dalbach S. *et al.* Increased frequency of genomic alternations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. *J Invest Dermatol* 2004, 119: 724-34.
52. Goetz D.H., Holmes M.A., Borregaard N. *et al.* The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 1997; 10: 1033-43.
53. Hackbarth C.J., Chambers H.F., Sande M.A. Serum bactericidal activity of rifampicin in combination with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986, 29: 611-613.
54. Hancock R.E.W., Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000; 8: 402-10.
55. Harder J., Bartels J., Christophers E. *et al.* Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-13.
56. Harder J., Schroder J.M. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 2002; 277: 46779-84.
57. Harwig S.S., Ganz T., Lehrer R.I. Neutrophil defensins: purification, characterization and antimicrobial testing. *Methods Enzymol* 1994; 236: 160-72.
58. Hedstrom S.A. Treatment and prevention of recurrent staphylococcal furunculosis: clinical and bacteriological follow up. *Scand J Infect Dis* 1985, 17: 55-8.
59. Hong, Y., Hancock, R.E.W. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45: 1558-60.
60. Hoover DM, Wu Z, Tucker K *et al.* Antimicrobial characterization of human β -defensin -3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2804-9.
61. Hoss D.M., Feder H.M. jr. Addition of rifampin to conventional therapy for recurrent furunculosis. *Arch Dermatol* 1995, 131: 647-8.
62. Hsu C.T., Lin Y.T., Yang Y.H., Chiang B.L. The hyperimmunoglobulin E syndrome. *J Microbiol Immunol Infect* 2004, 37: 121-3.
63. Isenberg H.D. Clinical Microbiology Handbook. Asm Press, Washington DC 2003.
64. Jabłońska S., Chorzelski T. Zakażenia bakteryjne skóry [w] *Choroby skóry* Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2002.

65. Jabłoński L. *Podstawy mikrobiologii lekarskiej*, PZWL 1986; 194-204.
66. Jappe U, Petzoldt D, Wendt C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in inflammatory versus non-inflammatory skin diseases: who should be screened? *Acta Derm Venereol* 2004; 84: 181-6.
67. Jawetz E., Melnick J.L., Adalberg E.A. *Przegląd Mikrobiologii Lekarskiej*. PZWL1991.
68. Johansen, L., Labischinski, H., Burghaus, P., Giesbrecht, P. Acetylation in different phases of growth of staphylococci and their relation to cell wall degradability by lysozyme. In: Hakenbeck, R., Holtje, J.V., Labischinski, H., editors. *The target of penicillin*. Berlin, New York: Walter de Gruyter & Co, 1983: 261-6.
69. Kaatz G.W., Seo S.M., Kuble Ch.A. Efflux – mediated fluorochinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1086-94.
70. Kaatz G.W., Seo S.M., O'Brien L. *et al.* Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000.
71. Kashima M. H1 histones contribute to candidacidal activities of human epidermal extract. *J Dermatol* 1991; 18: 695-706.
72. Kędzia W. Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. PZWL 1990.
73. Kieffer A.E., Goumon Y., Ruh O. *et al.* The N- and C- terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *Faseb J* 2003; 17: 776-8.
74. Klemptner M.S., Styrt B. Prevention of recurrent staphylococcal skin infections with low-dose clindamycin therapy. *JAMA* 1988; 260, 2682-5.
75. Kloos W.E., Musselwhite M.S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol* 1975; 30: 381-5.
76. Kluytmans J.A.J.W., Mouton J.W., Ijzerman E.P.F. *et al.* Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. *J Inf Dis* 1995; 171: 216-19.
77. Kowalska K., Carr D.B., Lipkowski A.W. Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci* 2002; 71: 747-50.
78. Krawczyk B, Lewandowski K, Bronk M *et al.* Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS-fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Microbiol Methods* 2003; 52: 341-51.
79. Krawczyk B, Naumiuk L, Lewandowski K *et al.* Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. *Immun Med Microbiol* 2003; 38: 241-8.
80. Kwan T., Liu J., DuBow M., Gros P., Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5174-9.
81. Lambert R.W., Campton K., Ding W. *et al.* Langerhans cell expression of neuropeptide Y and peptide YY. *Neuropeptides* 2002; 36: 246-51.

82. Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S. *et al.* Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immun Met* 1991;137: 167-173.
83. Leigh D.A. Treatment of familial staphylococcal infection. *J Antimic Chem* 1979; 5: 497-9.
84. Levy S.B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1086-94.
85. Levy R., Schaeffer F. Successful treatment of a patient with recurrent furunculosis by vitamin C: improvement of clinical course and of impaired neutrophil functions. *Int J Dermatol* 1993, 32: 832-4.
86. Levy R., Shriker O., Poath A. Witamin C for the treatment of recurrent furunculosis in patients with impaired neutrophil functions. *J Infect Dis* 1996; 173: 1502-5.
87. Liu L., Roberts A.A., Ganz T. By IL-1 signaling, monocyte – derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003; 170: 575-80.
88. Loughlin, M.F., Jones, M.V., Lambert, P.A. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics, *J Antimicrob Chemother* 2002, 49: 631-9.
89. Lyon B.R., Skurray R.A. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 1987; 51: 88-134.
90. Łęski T., Hryniewicz W. Mupirocyna – natura chemiczna oraz jej zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteryjnych. *Nowa Klinika* 1999; 6: 533-36.
91. Mahé E., Griszin N., Descamps V., Cricx B. Furunculosis and IgG subclass deficiency. *Dermatology* 2004; 208: 84-5.
92. Malm,J., Sorensen, O., Persson, T. *et al.* The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Inf Immun* 2000, 68: 4297-302.
93. Mangeney N., Drollee K., Cloitre V. *et al.* Comparative pulsed-field gel electrophoresis typing of gentamicin-resistant and –susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in France between 1991 and 1998. Changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 2002; 51: 262-8.
94. Marchini G., Lindow S., Brismar H. *et al.* The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br J Dermatol* 2002;147: 1127-34.
95. Masiga D.K., Turner C.M. Amplified (restriction) fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Methods Mol Biol* 2004; 270: 173-86.
96. Masny A., Plocienniczak A. Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. *Bio Techniques* 2001; 31: 930-6.
97. Mc Clelland M., Welsh J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Appl* 1994; 4: 59-65.
98. Meyer-Hoffert U., Wichmann N., Schwichtenberg L. *et al.* Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes. *Exp Dermatol* 2003, 12: 418-25.

99. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Jeljaszewicz J. Charakterystyka plazmidów penicylinazowych u szczepów *Staphylococcus aureus*. *Med Dośw Mikrobiol* 1999; 51: 1-8.
100. Mullis K., Faloone F. Specific synthesis of DNA in vitro via Polymerase-Catalyzed Reaction. *Methods in Enzymology* 1987, 155: 335-350.
101. Murakami M., Lopez-Garcia B., Graff M. *et al.* Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 2004; 172: 3070-7.
102. Neyfakh A.A. Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol* 1997; 5: 309-13.
103. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 516-23.
104. Noble W.C. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection. *Br J Dermatol* 1998; 139: 9-12.
105. Nomura I., Gao B., Boguniewicz M., Darst M.A. *et al.* Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 112: 1195-1202.
106. Nomura I., Goleva E., Howell M D *et al.* Cytokine Milieu of Atopic dermatitis, as Compared to Psoriasis, Skin Prevents Induction of Innate Immune Response Genes. *J Immunol.* 2003; 171: 3262-9.
107. Novick R.P. The *Staphylococcus* as a molecular genetic system [w]: *Molecular biology of the staphylococci*. red Novick P., Skurray R.A. VCH Publishers, Inc. New York, 1990; 1-37.
108. Nowicki R., Arłukowicz E., Barańska-Rybak W., Samet A. Resistance to clindamycin and erythromycin of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the ambulatory patients with skin lesions in 1998-2001. European Academy of Dermatology and Venereology *JEADV* 2003, 17 (suppl 3), 189.
109. Nowicki R. Barańska – Rybak W., Samet A., Arłukowicz E. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in children and adolescents with recurrent furunculosis. *Medicus* 2002, 4: 30-3.
110. Nowicki R., Barańska – Rybak W., Samet A., Arłukowicz E. Ropne choroby o etiologii gronkowcowej. *Przew Lek* 2002; 4: 57-60.
111. Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C. i wsp. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002, 347: 1151-60.
112. Oono T., Huh W.K., Shirafuji Y i wsp. Localization of human beta- defensin-2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis. *Br J Dermatol* 2003, 148: 188-91.
113. Otto M., Gotz F. ABC transporters of staphylococci. *Res Microbiol* 2001; 152, 351-6.
114. Parish C.A., Jiang H., Tokiwa Y. *et al.* Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 377-82.

115. Paulsen I.T., Firth N., Skurray R.A. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. [w]: *The staphylococci in human disease*, red. Crossley K.B., Archer G.R., Churchill Livington, New York, 1997; 175-212.
116. PCR Applications Mannual Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. 1995, 8-13, 27-32, 80-113.
117. Peterson P.K., Verhoef J., Sabath L.D., Quie P.G. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun* 1977; 15: 760-64.
118. Polyzou A., Slavakis A., Pournaras S. *et al.* Predominance of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone susceptible to erythromycin and several other non- β -lactam antibiotics in a greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001, 48: 231-4.
119. Proctor, V.A., Cunningham, F.E. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1988; 26, 359-95.
120. Ramsey M.A., Bradley S.F., Kauffman C.A., Morton T.M. Identification of chromosomal location of *mupA* gene, encoding low level mupirocin resistance In staphylococcal isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2820-3.
121. Rebora A., Dallegri F., Patrone F. Neutrophil dysfunction and repeated infections: influence of levamisole and ascorbic acid. *Br J Dermatol* 1980; 102: 49-56.
122. Rogers D.E., Tompsett R. The survival of staphylococci within human leukocytes. *J Exp Med* 1952, 95: 209-230.
123. Rosen H., Michel B.R. Redundant contribution of myeloperoxidase-dependent systems to neutrophil mediated killing of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997; 65: 4173-8.
124. Schitteck B., Hipfel R., Sauer B. *et al.* Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2001; 2: 1133-7.
125. Scov L., Baadsgaard O. Superantigens. *Arch Dermatol* 1995; 131: 829-31.
126. Sensi P. History of the development of rifampicin. *Rev Infect Dis* 1983, 5: 402-6.
127. Shannon K.P., French G.L. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram – negative isolates at a London teaching hospital, 1995-2000. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53 (5): 818-25.
128. Siech P.Ch., Siegel S.A., Rogers B. *et al.* Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6602-6.
129. Simpson A.J., Maxwell A.I., Govan J.R. *et al.* Elafin (elastase – specific inhibitor) has anti—microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* 1999; 452: 309-13.
130. Słomski R., Szałata M., Napierała D. A. *et al.* Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) z Przykłady analiz DNA Słomski R. red. Wyd. Akademii Rolniczej Poznań 2001, 37-50, 53-74, 112-116, 191-195.
131. Smith T.L., Jarvis W.R. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection* 1999, 1: 795-805.

132. Sohnle P.G., Hunter M.J., Hahn B. *et al.* Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* 2000; 182: 1272-5.
133. Sörensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabranga, G.S., Hiemstra, P.S., Borregaard, N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001; 97: 3951-9.
134. Stenger S., Hanson D.A., Teitelbaum R. *et al.* An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282: 121-5.
135. Strange P., Show L., Lisby S., Nielsen P.L. Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. *Arch Dermatol.* 1996, 132: 27-33.
136. Struelens, M. J., F. Rost, A. Deplano, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* bacteremia after biliary endoscopy: an outbreak investigation using DNA macrorestriction analysis. *Am J Med.* 1993;95:489-98.
137. Swartz M.N. Furuncles and carbuncles; in Mandel G.L., Bennett J.E., Dollin R. (eds): *Mandel, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. 4. New York, Churchill Livingstone, 1995; 912-13.
138. Szarmach H., Rutecka – Bowin I. Zmiany wrażliwości na antybiotyki gronkowców złocistych wyhodowanych od chorych z dermatozami ropnymi. *Przegl Dermatol.* 1969; 56: 435-40.
139. Szarmach H., Rutecka – Bowin I., Rosiak E. Typy gronkowców złocistych wyhodowanych od chorych z dermatozami ropnymi. *Przegl Dermatol.* 1969; 56: 350-6.
140. Szarmach H., Samet A., Placek W., Jasiel – Walikowska E. Retrospektywna ocena wyników leczenia czyraczności. Postępy w etiopatogenezie, diagnostyce i leczeniu chorób skóry i wenerycznych. Obrady XXIV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, Gdańsk 1992, T2; 786-9.
141. Takahashi M., Horiuchi Y., Tezuka T. Presence of bactericidal/permeability – increasing protein in human and rat skin. *Exp Dermatol* 2004; 13: 55-60.
142. Takahashi M., Tezuka T., Katunuma N. Inhibition of growth and cysteine proteinase activity of *Staphylococcus aureus* V8 by phosphorylated cystatin alpha in skin cornified envelope. *FEBS Lett* 1994; 355: 275-8.
143. Tanaka M., Sato K., Kimura Y., Hayakawa I. Inhibition by quinolones of DNA gyrase from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1489-91.
144. Tang Y.Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. 2002; 70: 6524-33.
145. Tasiemski A., Hammand H., Vandenbulcke F. *et al.* Presence of chromogranin – derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides. *Blood* 2002; 100: 553-9.
146. Tenover, F. C., Arbeit R. D., Goering R. V. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.

147. Tulloch L.G. Nasal carriage in staphylococcal skin infections. *Br Med J* 1954; 2: 912-13.
148. Tyski S., Hryniewicz W., Jeliaszewicz J. Purification and some properties of staphylococcal extracellular lipase. *Biochim Biophys Acta* 1983; 749: 312-17.
149. van der Zee A., Verbakel H., van Zon J.C. *et al.* Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence – based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (2): 342-9.
150. Wadstrom T., Paulsson M., Ljungh A. Molecular pathogenesis of staphylococcal infections: Microbial adhesion to extracellular matrix and colonization of wounded tissues and biomaterial surfaces [w] *Staphylococci and staphylococcal infection*. [red] Mollby R., Flock J.I., Nord C.E., Christensson B. [wyd] Gustav Fisher Verlag. 1994, 343-352.
151. Wecke, J., Lahav, M., Ginsburg, I., Giesbrecht, P. Cell wall degradation of *Staphylococcus aureus* by lysozyme. *Archives of Microbiology* 1982; 131:116-23.
152. Weijmer M.C., Nehring H., Welten C. Preliminary report: furunculosis and hypoferraemia. *Lancet* 1990, 336: 464-6.
153. Węgleński P. red. Genetyka molekularna. Identyfikacja zrekombinowanych genów PWN Warszawa 1995, 63-74, 160, 173-9.
154. Wheat L.J. Antibody response to peptidoglycan during staphylococcal infections. *J Infect Dis* 1983; 147: 16.
155. Wheat LJ, Kohler RB, White A. Prevention of infections of skin and skin structures. *Am J Med* 1984; 76: 187-190.
156. Williams R.E. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 1963, 27: 56-71.
157. Wingens M., van Bergen B.H., Hiemstra P.S. *et al.* Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 996-1002.
158. Witte W. Diagnostics, typing and taxonomy [w] *Gram Positive Pathogens* Fischetti VA, American Society for Microbiology, Washington DC, 2000.
159. Wojdyło M., Placek W. PCR – zastosowanie w dermatologii. *Derm Estet* 1999; 1, 140-6.
160. Zaiou M., Nizet V., Gallo R.L. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 810-16.
161. Zanetti, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leuk Biol* 2004; 75: 39-48.
162. Zaremba L.M., Borowski J. *Mikrobiologia lekarska*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1997.
163. Zimakoff J., Rosdahl V.T., Petersem W., Scheibel J. Recurrent staphylococcal furunculosis in families. *Scand J Infect Dis* 1988, 20: 403-5.

Spis ilustracji

Ryc. 1.	Strategia metody RAPD. Wykorzystanie jednego startera (czerwona strzałka) niespecyficznie przyłączającego się do wielu miejsc w DNA. Pozwala na uzyskanie specyficznego wzoru różnicującego badane genomy (A i B).	12
Ryc. 2.	Organizacja operonu rybosomalnego rrr u Procariota.	13
Ryc. 3.	Przebieg reakcji ADSRRS-fingerprinting.	17
Ryc. 4.	Czyrak w okolicy prawej pachy.	19
Ryc. 5.	Liczne czyraki na skórze brzucha.	20
Ryc. 6.	Kolonie <i>Staphylococcus aureus</i> na płytce krwawej Columbia.	32
Ryc. 7 i 8.	<i>Staphylococcus aureus</i> w barwieniu Grama, po lewej powiększenie 800×, po prawej 1600×.	32
Ryc. 9.	Po lewej stronie szkiełka: kontrola ujemna. Po prawej stronie: rozkład nadtlenu wodoru w obecności gronkowca złocistego wytwarzającego katalazę – widoczne pęcherzyki gazu.	32
Ryc. 10.	Antybiogram na podłożu Muller - Hinton II.	33
Ryc. 11.	Przykład typowania fagowego.	34
Ryc. 12.	Reakcja trawienia DNA	39
Ryc. 13.	Reakcja otrzymywania adaptorów	43
Ryc. 14.	Technika ADSRRS-fingerprinting.	47
Ryc. 15.	Występowanie poszczególnych fenotypów oporności w badanej puli szczepów.	56
Ryc. 16.	Analiza oporności na antybiotyki szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> uzyskanych od grupy kontrolnej.	57
Ryc. 17.	Typy fagowe występujące w puli badanych szczepów <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Ryc. 18.	Przynależność do tej samej (80%) lub różnej (20%) grupy fagowej szczepów izolowanych ze zmiany skórnej i nosa lub gardła.	59
Ryc. 19.	Wykres przedstawia brak różnic statystycznych między czasem trwania choroby (w latach) u pacjentów indywidualnych i pacjentów z czyracznością rodzinną.	60
Ryc. 20.	Wykres przedstawia brak wpływu czasu trwania choroby na oporność na antybiotyki izolowanych szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> (na osi X 0 oznacza szczep wielowrażliwy (WW), 1- oporny na 1 antybiotyk, 2- oporny na 2 antybiotyki, 3- oporny na 3 antybiotyki i 4 – oporny na 4 antybiotyki).	61
Ryc. 21.	Wykres przedstawia czas trwania choroby w poszczególnych rodzinach (I-IX) z czyracznością przewlekłą (Test Kruskala-Wallisa: H (8, N= 33) =18.08014 p = 0.0206).	61

- Ryc. 22. Przykładowy żel elektroforetyczny wyników uzyskanych przy pomocy techniki ADSRRS – fingerprinting.. Kolumna oznaczona M1 zawiera molekularny marker wielkości DNA(501, 489, 404, 331, 242 i 190 pz), natomiast M2 - molekularny marker wielkości (1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz). Numery nad kolumnami odpowiadają szczepom *Staphylococcus aureus*. Szczepy 38 i 39 reprezentują ten sam genotyp. 63
- Ryc. 23. Wyniki uzyskane techniką ADSRRS – fingerprinting dla dwóch kolonizacji (szczepy *Staphylococcus aureus* uzyskane odpowiednio ze zmiany skórnej, nosa i gardła): I (szczepy 13, 14 i 15) przedstawia identyczne genotypy w odróżnieniu od II (szczepy 79, 80, 81) reprezentowanej przez różne genotypy oraz rodziny nr IX, w obrębie której każdy izolat reprezentuje inny genotyp (szczepy 75, 77, 78). M2 - molekularny marker wielkości (1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz). K- – kontrola ujemna..... 64
- Ryc. 24. Przykładowy żel elektroforetyczny wyników uzyskanych techniką RAPD - PCR. M2- molekularny marker wielkości DNA (1008, 883, 615, 517, 466 i 396 pz), studzienki 70, 69, 81, 80, 79, 76, 73, 56, 55, 60, 67, 63 odpowiadają izolatom *Staphylococcus aureus*. 64
- Ryc. 25. Przykładowy żel elektroforetyczny wyników typowania metodą ADSRRS-fingerprinting uzyskanych dla czterech rodzin z czyracnością rodzinną. Kolumna oznaczona M1 zawiera molekularny marker wielkości DNA(501, 489, 404, 331, 242 i 190 pz), K- - kontrola ujemna. Rodzinę I reprezentują szczepy 58, 59, 60; II – 54, 55, 56; III- 65, 66, 67, 68 i IV- 76, 73, 74. 65
- Ryc. 26. Przykładowy żele elektroforetyczny wyników typowania PFGE uzyskany dla czterech rodzin z czyracnością rodzinną. M- molekularny marker wielkości fragmentów DNA (konkatamery faga λ, Biodra 170-3635). Rodzinę I reprezentują szczepy 58, 59, 60; II – 54, 55, 56; III- 65, 66, 67, 68 i IV- 76, 73, 74. 66
- Ryc. 27a. Wykres prezentuje brak korelacji między wrażliwością na LL- 37 i lizozym. Oś X przedstawia wrażliwość badanych szczepów w stosunku do lizozymu odpowiadającą średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii w RDA, natomiast oś Y odpowiada wrażliwości na LL-37 wyrażonej średnicą zahamowania wzrostu (w mm). 69
- Ryc. 27b. Wykres ten przedstawia brak korelacji między wrażliwością (W) i opornością (O) na erytromycynę a wrażliwością na LL-37 w RDA..... 69
- Ryc. 28a. Wrażliwość na LL-37, lizozym i mieszaninę obu peptydów dla szczepu *Staphylococcus aureus* opornego na lizozym uzyskana dzięki metodzie jednostek tworzących kolonie. 71
- Ryc. 28b. Wrażliwość na LL-37, lizozym i mieszaninę obu peptydów dla szczepu *Staphylococcus aureus* dla szczepu wrażliwego na lizozym uzyskana dzięki metodzie jednostek tworzących kolonie. 72
- Ryc. 28c. Zmniejszenie aktywności bakteriobójczej LL- 37 w obecności lizozymu w RDA. 72

Spis tabel

Tab. 1.	Aktywność enzymatyczna <i>Staphylococcus aureus</i> [6, 125, 146].	3
Tab. 2.	Właściwości toksyn gronkowcowych [26].	4
Tab. 3.	Podstawowy zestaw fagów stosowany w typowaniu <i>Staphylococcus aureus</i> .	7
Tab. 4.	Charakterystyka peptydów i protein demonstrujących działanie antybakteryjne (AMP) występujących w skórze ssaków.	27
Tab. 5.	Czas trwania choroby w badanej grupie pacjentów.	31
Tab. 6a.	Strefy zahamowania wzrostu <i>Staphylococcus aureus</i> (w mm) uzyskane metodą dyfuzyjno-krażkową w agarze.	53
Tab. 6b.	Wrażliwość szczepów na antybiotyki.	55
Tab. 7.	Fenotypy <i>Staphylococcus aureus</i> wyodrębnione na podstawie wzorów lekooporności.	55
Tab. 8.	Wyniki typowania bakteriofagowego szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową.	57
Tab. 9.	Zestawienie grup fagowych analizowanych szczepów bakteryjnych.	58
Tab. 10.	Zestawienie genotypów uzyskanych przy pomocy techniki ADSRRS – fingerprinting i odpowiadających im szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> .	62
Tab. 11.	Tabela przedstawia analizę porównawczą szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> izolowanych od poszczególnych członków 4 rodzin z czyracznością rodzinną.	67
Tab. 12.	Wrażliwość szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> na lizozym, LL-37 i mieszaninę lizozymu i LL-37 w stężeniu 50µM uzyskana przy pomocy techniki radiodyfuzji.	70