

1. Streszczenie

W pracy przeprowadzono fenotypową i genotypową charakterystykę 121 szczepów: *Staphylococcus epidermidis* (61) i *Staphylococcus haemolyticus* (60). Oceniono właściwości adhezyjne gronkowców oraz zdolność do wytwarzania biofilmu na implantach ortopedycznych wykonanych z różnych pod względem chemicznym materiałów (stal, stal pokryta tytanem, stal pokryta nanokrystalicznym diamentem). Zanalizowano wpływ wybranych związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych: antyseptyków (dichlorowodorek oktenidyny, chlorheksydyna), antybiotyków przeciwgronkowcowych (cefazolina, gentamycyna) jak i endogennego antybiotyku peptydowego Camel na proces tworzenia, ale także redukcji już utworzonej, dojrzałej struktury biofilmu.

Właściwości powierzchniowe komórek drobnoustroju mogą istotnie wpływać na kolonizację przez bakterie różnych powierzchni. Większość analizowanych szczepów wykazywała hydrofobowość, z różnym stopniem nasilenia. Szczepy *S. haemolyticus* o hydrofobowych i silnie hydrofobowych powierzchniach częściej formowały biofilm na implantach stalowych, w przeciwieństwie do szczepów *S. epidermidis*.

Wytwarzanie śluzu zewnątrzkomórkowego ułatwia znacznie kolonizację elementów obcych. Średnio połowa analizowanych szczepów wykazywała zdolność do produkcji śluzu. Wykazano również zależność pomiędzy zdolnością do wytwarzania śluzu przez szczepy *S. epidermidis* a formowaniem biofilmu na wkrętach do kości korowej. Zależności tej nie obserwowano u szczepów *S. haemolyticus*.

Przyleganie mikroorganizmów i wydzielanie śluzu prowadzi do wytworzenia struktur biofilmu. Analiza zdolności tworzenia biofilmu na wkrętach do kości korowej z zastosowaniem jakościowej metody Richardsa wykazała, że biomateriałem najbardziej podatnym na tworzenie biofilmu okazały się implanty stalowe, najbardziej opornym implanty pokryte warstwą nanokrystalicznego diamentu. Częściej biofilm tworzył *S. epidermidis*. Ilościowa ocena z oznaczeniem zakresu jednostek tworzących kolonie, mikroskopia elektronowa i konfokalna wykazały korelację z metodą jakościową - biomateriałem, na którym biofilm tworzył się najwolniej był nanokrystaliczny diament, a dominującym gatunkiem *S. epidermidis*.

Ponieważ istotne w procesie tworzenia biofilmu są czynniki genotypowe, w kolejnym etapie pracy oceniono obecność genów mogących mieć wpływ na proces tworzenia biofilmu na implantach ortopedycznych. Najistotniejszą częścią składową biofilmu jest cząsteczka PIA, której wytwarzanie uzależnione jest od obecności operonu *icaADBC*. Wszystkie geny

wchodzące w skład tego operonu wykryto u niewielkiego odsetka (28%) spośród 121 analizowanych szczepów, zauważono zdecydowaną przewagę *S. epidermidis* nad *S. haemolyticus* jako „nośnika” poszukiwanych elementów. Wykazano zależność pomiędzy genami operonu *icaADBC* a tworzeniem biofilmu u obu analizowanych gatunków.

Ponieważ coraz częściej mówi się o biofilmie *ica*-niezależnym w dalszej części pracy zanalizowano obecność genów *embp*, *aap*, *bhp* i *atlE* mogących mieć wpływ na tworzenie biofilmu na wkrętach do kości korowej. Geny *aap* i *bhp* nie wpływały na tworzenie biofilmu. Wykazano zwiększoną zdolność do tworzenia biofilmu na implantach ortopedycznych przez szczepy *S. epidermidis* posiadające geny *atlE* i *embp*.

Ponieważ czynnikiem zwiększającym ryzyko przedłużenia się infekcji związanej z zakażeniami CNS jest ich wielolekooporność. W dalszym etapie pracy oznaczano wrażliwość szczepów na antybiotyki i dokonano oceny wpływu różnych związków przeciwdrobnoustrojowych na proces formowania i redukcji biofilmu. Szczepy *S. haemolyticus* znacznie częściej były metacyclinooporne, ale analiza statystyczna nie potwierdziła jednak istotności różnicy. Stwierdzono większą wrażliwość szczepów *S. haemolyticus* na antyseptyki i peptyd Camel a jednocześnie większą niż u *S. epidermidis* oporność na antybiotyki. Co ważne, prawie wszystkie wrażliwe, w formie planktonowej, analizowane szczepy zmieniały swój profil wrażliwości na całkowicie odporne w utworzonej strukturze biofilmu.

Po oznaczeniu wrażliwości szczepów na wybrane związki badano wpływ analizowanych preparatów na proces adhezji i formowania biofilmu na wkrętach do kości korowej ale także skuteczność preparatów w redukcji dojrzałej struktury biofilmu. Ocena wpływu dichlorowodoru oktenidyny na tworzenie biofilmu nie wykazała istotnej różnicy pomiędzy analizowanymi gatunkami gronkowców. Ocena wpływu antyseptyku na redukcję utworzonej na implantach ortopedycznych struktury biofilmu wykazała większą wrażliwość szczepów *S. haemolyticus*. Większą wrażliwość szczepów *S. haemolyticus* niż *S. epidermidis* wykazano również w ocenie wpływu chlorheksydyny na tworzenie ale też eradykację biofilmu. Wpływ cefazoliny i gentamycyny na formowanie biofilmu i jego eradykację był zależny od zastosowanego stężenia antybiotyku – im wyższe stężenie antybiotyku tym większa redukcja liczby adherujących lub tworzących struktury biofilmu bakterii. Peptyd Camel zmniejszał zdolności adhezyjne gronkowców i tworzenie biofilmu. Wyraźny spadek zdolności adhezyjnych obserwowano w stężeniach odpowiadających wielokrotności wartości minimalnego stężenia hamującego.

