

Received: 08.03.2017  
Accepted: 11.10.2017  
Published: 02.03.2018

## Biofilm *Staphylococcus aureus* i rola bakteriofagów w jego eradykacji

### *Staphylococcus aureus* biofilm and the role of bacteriophages in its eradication

Natalia Łubowska, Lidia Piechowicz

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

#### Streszczenie

Zdolność wytwarzania biofilmu jest ważnym czynnikiem wirulencji wielu drobnoustrojów. Zakażenia z jego udziałem dotyczą prawie 65% wszystkich infekcji u ludzi. Biofilm może się rozwijać na cewnikach wewnątrznaczyniowych oraz implantach, takich jak sztuczne zastawki serca czy protezy stawowe. Wszczepiane elementy pokrywają się biofilmem, który staje się rezerwuarem drobnoustrojów i może być przyczyną zakażeń (zapalenie wsierdza, ropnie głębokie tkanek, septyczne zapalenie stawów, zapalenie kości i szpiku). Zwalczanie infekcji wywołanych przez komórki rosnące w strukturze biofilmu jest trudne i często kończy się niepowodzeniem. Przyczyną tego zjawiska jest podwyższona oporność biofilmu na czynniki przeciwbakteryjne oraz zwiększona zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej. Większość przypadków infekcji powiązanych z biofilmem dotyczy szczepów *Staphylococcus aureus*. Ze względu na częste występowanie mechanizmów oporności na antybiotyki (np. oporność na metycylinę) oraz wytwarzanie biofilmu, terapia zakażeń gronkowcowych jest dużym wyzwaniem dla klinicystów. Zakażenia wielolekoopornymi bakteriami oraz ograniczenia w badaniach nad nowymi preparatami sprawiły, że po prawie 100 latach od odkrycia, bakteriofagi stały się głównym przedmiotem zainteresowania naukowców na całym świecie jako nowa możliwość terapeutyczna. Badania *in vitro* na szczepach *S. aureus* wykazały, że mogą nie tylko zapobiegać tworzeniu się biofilmu, ale również eliminować bakterie z dojrzałej struktury. Istotną rolę w tych procesach odgrywają depolimerazy – enzymy wydzielane przez niektóre bakteriofagi. Ułatwiają wirusom penetrację do wewnętrznych warstw biofilmu, naruszając jego strukturę. Można zatem wnioskować, że zastosowanie bakteriofagów może być ważną metodą w zapobieganiu i zwalczaniu biofilmów bakteryjnych, w tym wytwarzanych przez *S. aureus*.

**Słowa kluczowe:** bakteriofagi • biofilm bakteryjny • *S. aureus*

#### Summary

The ability to form biofilm is an important virulence factor of many microorganisms. Infections involving biofilms account for approx. 65% of all human infections. Biofilms may develop on intravascular catheters or implanted devices such as prosthetic heart valves. Implanted devices are covered by biofilm and become reservoirs of microorganisms which can be a cause of persistent infections (endocarditis, deep tissue abscesses, septic arthritis, and osteomyelitis). Treatment of infections caused by biofilm-growing cells is linked to a high risk of failure due to an extreme resistance to antimicrobial agents and increased capacity to evade the immune responses. A large number of biofilm-associated infections involve *Staphylococcus aureus*. Treatment of staphylococcal infections is a great challenge for clinicians because of the presence of various mechanisms of resistance to antibiotics in *S. aureus*, for example methicillin resistance and biofilm production. Therapeutic difficulties related with antibiotic-resistant bacteria and

	limitations in research on new antimicrobials were the reasons that nearly 100 years after discovery, bacteriophages caught the attention of scientists around the world as a new therapeutic option for bacterial infections. Numerous <i>in vitro</i> studies on <i>S. aureus</i> strains showed that phages can both prevent biofilm formation and contribute to the elimination of bacteria from the mature biofilm structure. The major role in biofilm eradication play depolymerases produced by some phages which facilitate their penetration into the inner layers of biofilm by disturbing the biofilm structure. This leads to the conclusion that bacteriophages treatment might become a new strategy in the prevention and eradication of infectious bacterial biofilms, including these formed by <i>S. aureus</i> .
<b>Keywords:</b>	<b>bacterial biofilm • bacteriophages • <i>S. aureus</i></b>
<b>GICID:</b>	01.3001.0011.5965
<b>DOI:</b>	10.5604/01.3001.0011.5965
<b>Word count:</b>	3886
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	1
<b>References:</b>	47

**Adres autorki:** mgr inż. Natalia Łubowska, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębowa 25, 80-204 Gdańsk; e-mail: nlubowska@gumed.edu.pl

## WYTWARZANIE BIOFILMU PRZEZ SZCZEPY *S. AUREUS* I JEGO ZNACZENIE

Szczepy *S. aureus* powszechnie występują u ludzi, u około 30% zdrowych ludzi kolonizują przedśrodek nosa lub gardło, co określa się stanem nosicielstwa. Jednocześnie, *S. aureus* jest główną przyczyną ropnych zakażeń skórnych, posocznicy, zapalenia wsierdza (IE) czy infekcji w obrębie układu kostno-stawowego [45]. Wiele spośród nich może przybierać postać zakażeń przewlekłych, w których duży udział przypisuje się zdolności tego patogenu do wytwarzania biofilmu. Biofilm to wielokomórkowe zorganizowane skupisko drobnoustrojów otoczonych wydzielanymi przez siebie polimerami, określanymi jako EPS (extracellular polymeric substances). Należą do nich polisacharydy, białka oraz zewnątrzkomórkowy kwas deoksyrybonukleinowy (eDNA). EPS tworzy macierz biofilmu, która utrzymuje wszystkie komórki w skupisku i tworzy barierę dla czynników środowiska [11,18].

W procesie tworzenia biofilmu można wyróżnić trzy fazy – adhezję, dojrzewanie oraz dyspersję. Adhezja, czyli przyłączenie drobnoustrojów do powierzchni tkanek czy materiałów biomedycznych, zachodzi pod wpływem oddziaływań hydrofobowych, elektrostatycznych oraz adhezyn znajdujących się na powierzchni komórek. Adhezyny odgrywają główną rolę w pierwszym etapie tworzenia biofilmu, gdyż rozpoznają swoiste receptory na komórkach gospodarza (np. komórkach nabłonkowych, śródbłonka) aby następnie połączyć się z nimi. Mogą się również wiązać z fibrynogenem czy fibronektyną – białkami osocza, które często pokrywają powierzchnie biomateriałów. Przykładem dobrze znanych adhezyn występujących w szczepach *S. aureus* i nadających im szczególną zdolność do adhezji do róż-

nych typów komórek, jest grupa białek powierzchniowych określanych mianem MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) [22,35].

W następującej po adhezji fazie dojrzewania, bakterie wytwarzają międzykomórkową macierz (EPS) i różnicują się tworząc wielowarstwową strukturę. Głównym składnikiem macierzy międzykomórkowej biofilmu *S. aureus* jest polisacharydowa substancja międzykomórkowa PIA (polysaccharide intercellular adhesin), znana również jako poli- $\beta$ -N-acetyloglukozamina (PNAG). Zbudowana jest z cząsteczek N-acetyloglukozaminy połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,6 i kodują ją geny z operonu *icaADBC*, podobnie jak białka odpowiedzialne za jej syntezę, wydzielanie i modyfikację. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że polimer PIA odgrywa ważną rolę w integralności strukturalnej biofilmów, niemniej jednak w licznych badaniach zidentyfikowano szczepy *S. aureus*, które są zdolne do tworzenia biofilmu niezależnie od czynnika PIA [22,23].

Faza dyspersji czyli odrywania się komórek od struktury biofilmu, umożliwia rozprzestrzenienie się bakterii, poprzez krew czy inne płyny ustrojowe oraz kolonizację nowych miejsc. Duży udział w odłączaniu komórek ze struktury biofilmu przypisuje się enzymatycznej degradacji macierzy [23].

W strukturze biofilmu można wyróżnić odrębne subpopulacje komórek. Ich rozwój jest determinowany przez odmienne warunki środowiska. Zmniejszająca się wraz z odległością od powierzchni biofilmu ilość tlenu i składników odżywczych ma podstawowe znaczenie w tym procesie. Badania *in vitro*, prowadzone na modelu

biofilmu gronkowcowego, wykazały obecność czterech subpopulacji komórek różniących się stanem metabolicznym. Są to komórki: rosnące w warunkach tlenowych, beztlenowych (fermentujące), będące w stanie uśpionia (w tym komórki bardzo wolno rosnące i tzw. persister) oraz martwe [36]. Subpopulacja komórek „persister” jest genetycznie identyczna z pozostałymi komórkami biofilmu, lecz - co wymaga podkreślenia - różni się od nich dużą tolerancją na antybiotyki, ze względu na spowolnione tempo podziałów komórkowych lub ich brak [20,29,39].

Wzrost *S. aureus* w postaci biofilmu wymaga odpowiednich adaptacji na poziomie genetycznym. W czasie jego tworzenia ekspresja niektórych genów zostaje wzmocniona, innych natomiast wygaszona. Potwierdzają to liczne badania genetyczne. Beenken i wsp., dzięki analizie transkryptomu klinicznego szczepu *S. aureus* UAMS-1 zidentyfikowali 48 genów ze wzmocnioną i 84 geny z osłabioną ekspresją występującą w czasie tworzenia biofilmu, w porównaniu z formami planktonicznymi [4]. Zróżnicowanie ekspresji genów w biofilmie wykazali również Brady i wsp. [6], na przykładzie białek związanych ze ścianą komórkową. Jednym z nich była glukozaminidaza, białko zaangażowane w hydrolizę peptydoglikanu, która zachodzi z dużą wydajnością w komórkach aktywnie dzielących się. Jej obecność stwierdzono jedynie w części mikrokolonii tworzących biofilm, co może sugerować występowanie komórek aktywnie dzielących się w mikrokolonii z glukozaminidazą. Podobnie lipoproteina SA0688, wykrywana tylko w komórkach aktywnych metabolicznie, wykryta została tylko w części populacji komórek biofilmu.

Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że obecność genu warunkującego oporność na metycylinę (*mecA*) hamuje PIA-zależne formowanie biofilmu u klinicznych szczepów MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) [25,30]. Szczepy *S. aureus* wrażliwe na metycylinę (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) powszechnie wytwarzają biofilm zależny od PIA. Wytwarzanie biofilmu u szczepów MRSA jest natomiast powiązane z autolizyną Alt, białkami wiążącymi fibronektynę (FnBP) oraz eDNA (extracellular DNA). Nabycie oporności na metycylinę prawdopodobnie tłumi wytwarzanie biofilmu zależnego od PIA i promuje powstawanie biofilmów związanych z białkami powierzchniowymi [31,34].

Ważną rolę podczas tworzenia biofilmu pełnią również geny *sarA* (staphylococcal accessory regulator) [46] oraz *agr* (accessory gene regulator) [5]. *SarA* jest znanym represorem czterech głównych zewnątrzkomórkowych proteaz. Sugeruje się, że mutanty MRSA pozbawione genu *sarA* mogą nie wytwarzać biofilmu, ze względu na zwiększoną aktywność proteaz, które niszczą białkową macierz będącą podstawą biofilmu MRSA. Natomiast delecja w systemie regulacji ekspresji genów *agr* wpływa na zwiększenie tworzenia biofilmu przez kliniczne szczepy MRSA, nie mając jednocześnie istotnego wpływu na szczepy MSSA, które powszechnie tworzą

biofilm polisacharydowy, niezależny od obecności proteaz. Wynika to prawdopodobnie z pozytywnej regulacji przez system *agr* ekspresji czterech głównych proteaz komórkowych, w przeciwieństwie do genów *sarA* [27].

Zdolność do wytwarzania w pełni ukształtowanego biofilmu różni się między szczepami w zależności od miejsca ich bytowania. Udowodniono, że szczepy izolowane z miejsc, w których dochodzi do przepływu płynów ustrojowych są mniej zdolne do tworzenia biofilmu w porównaniu do izolatów pozyskanych ze skóry, kości i układu oddechowego [37,42]. Badania przeprowadzone przez Smith i wsp. [42] wykazały, że szczepy *S. aureus* wyizolowane ze skóry są bardziej zdolne do tworzenia biofilmu ( $p = 0,0002$ ) niż szczepy wyizolowane z innych części ciała, w tym z nosa, gardła, układu moczowo-płciowego.

Struktura biofilmu zabezpiecza bakterie przed wieloma czynnikami środowiska, takimi jak promieniowanie UV, toksyczne metale, działanie kwasów, odwodnienie i zasolenie, fagocytoza oraz działanie antybiotyków i środków antybakteryjnych [15]. Liczne badania wskazują, że drobnoustroje występujące w postaci biofilmu wykazują brak wrażliwości na antybiotyki, nawet gdy planktoniczne postaci tego samego drobnoustroju są na dany antybiotyk wrażliwe. Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (MIC) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) dla niektórych antybiotyków, wobec bakterii tworzących biofilm, może być nawet 1000-krotnie wyższe niż dla form planktonicznych [18]. Oporność ta jest wynikiem wielu mechanizmów unikatowych dla biofilmu. Jednym z nich jest ograniczona penetracja środka przeciwbakteryjnego spowodowana obecnością fizycznej bariery jaką tworzy macierz pozakomórkowa [10]. Bariera utworzona przez EPS może chronić bakterie przed działaniem światła UV i odwodnieniem. EPS zapewnia również ochronę przed toksycznymi metalami prawdopodobnie przez związanie ich i utrudnienie dyfuzji [15,44]. Na brak skuteczności działania antybiotyków ma również wpływ odmienne środowisko głębszych warstw biofilmu. Zmniejszająca się wraz z odległością od powierzchni dostępność substancji odżywczych i tlenu, obniża aktywność metaboliczną bakterii [26].

Stale poszerzająca się wiedza o naturze i właściwościach bakterii rozwijających się w postaci biofilmu jest podstawą efektywnej profilaktyki, diagnostyki i leczenia chorych z przewlekłymi zakażeniami związanymi z jego występowaniem. Metody, które są obecnie wykorzystywane do zwalczania biofilmu, nie są jednak wystarczająco skuteczne [18]. Jednym z obiecujących narzędzi do zwalczania *S. aureus* są bakteriofagi [1].

#### WŁAŚCIWOŚCI BAKTERIOFAGÓW PRZYDATNE W ZWALCZANIU BIOFILMU BAKTERYJNEGO

Bakteriofagi (w skrócie fagi) są to wirusy, które atakują komórki bakterii, a w przypadku fagów litycznych, powodują lizę komórki bakteryjnej [43]. Są najbardziej liczną i zróżnicowaną grupą wirusów [2]; szacuje się, że

ich liczba może sięgać nawet  $10^{31}$  cząstek. Stąd można przypuszczać, że na każdy istniejący szczep bakterii przypada przynajmniej jeden typ faga swoistego wobec bakteryjnego gospodarza [16].

Bakteriofagi mają wiele cech, dzięki którym mogą być alternatywą dla antybiotyków w terapii zakażeń bakteryjnych. Jedną z nich jest ich zdolność do infekowania wyłącznie komórek bakteryjnych, podczas gdy ze względu na brak odpowiednich receptorów, nie jest możliwa adhezja bakteriofaga do powierzchni komórki eukariotycznej. Wirusy koncentrują się w miejscu infekcji, wykładniczo zwiększając swoją liczbę. Oznacza to, że wraz ze zwiększeniem liczby bakterii wielokrotnie wzrasta również liczba wirionów. Ta unikatowa zdolność pozwala na uzyskanie optymalnego efektu terapeutycznego bez konieczności wielokrotnego dawkowania fagów. Natomiast w chwili zniszczenia komórek bakterii miano fagów zaczyna się zmniejszać, aż do ich usunięcia z ustroju [28,43]. W przeciwieństwie do bakteriofagów, utrzymanie odpowiednio wysokiego, terapeutycznego stężenia antybiotyków w organizmie, ze względu na ich metabolizm i usuwanie, wymaga podawania kolejnych dawek [7,43]. Bakteriofagi charakteryzują się dużą swoistością, ograniczając działanie do określonego gatunku, a nawet szczepu bakterii. Dzięki tej właściwości nie wpływają na fizjologiczną florę bakteryjną, co zmniejsza ryzyko rozwoju wtórnych zakażeń, często związanych z leczeniem antybiotykami [30]. Najbardziej niepokojącym zjawiskiem związanym ze stosowaniem leków przeciwbakteryjnych jest postępująca oporność bakterii, często obejmująca wiele różnych grup antybiotyków. W przypadku bakteriofagów, problem ten nie jest tak znaczący ze względu na mutacje zachodzące w genomie faga, które umożliwiają łatwiejszą adaptację wirusa do zmienionych komórek bakterii [7]. Zakres działania fagów jest wąski i obejmuje jeden, rzadziej kilka rodzajów bakterii, przez co bakterie odporne na jeden rodzaj faga pozostają podatne na inne, o podobnym działaniu [24,43]. Ponadto, bakteriofagi mogą się wiązać z receptorami bakteryjnymi, często ważnymi w procesie patogenezy. U bakterii opornych na fagi w mechanizmie modyfikacji lub utraty receptora, zdolności adaptacyjne do warunków środowiska, a w niektórych przypadkach wirulencja bakterii, mogą ulec drastycznemu osłabieniu [41]. Co więcej, fagi mogą być wykorzystane do zwalczania wielolekoopornych bakterii nie tylko w postaci planktonicznej, ale również komórek bytujących w biofilmie, włączając w to komórki przetrwałe. Wśród zalet bakteriofagów wymienić należy również: stosunkowo tanie i szybkie wytwarzanie, możliwość modyfikacji genetycznej, możliwość łączenia z innymi preparatami oraz różnorodność dawkowania [9].

Bakteriofagi mają również cechy, które budzą obawy i mogą ograniczać skuteczność terapii. Należy do nich zdolność do przenoszenia obcych genów, dzięki czemu bakterie mogą nabywać nowe, często trudne do przewidzenia, właściwości. Problemem jest również wąski zakres działania bakteriofagów, który wymaga przepro-

wadzenia oceny wrażliwości bakterii na bakteriofaga jeszcze przed podaniem pacjentowi preparatu fagowego. Trudności związane z terapią fagową mogą być zminimalizowane dzięki zastosowaniu odpowiedniej selekcji bakteriofagów oraz lepszemu zrozumieniu mechanizmów ich działania *in vivo* [24,28].

## UDZIAŁ BAKTERIOFAGÓW W ZWALCZANIU BIOFILMU BAKTERYJNEGO

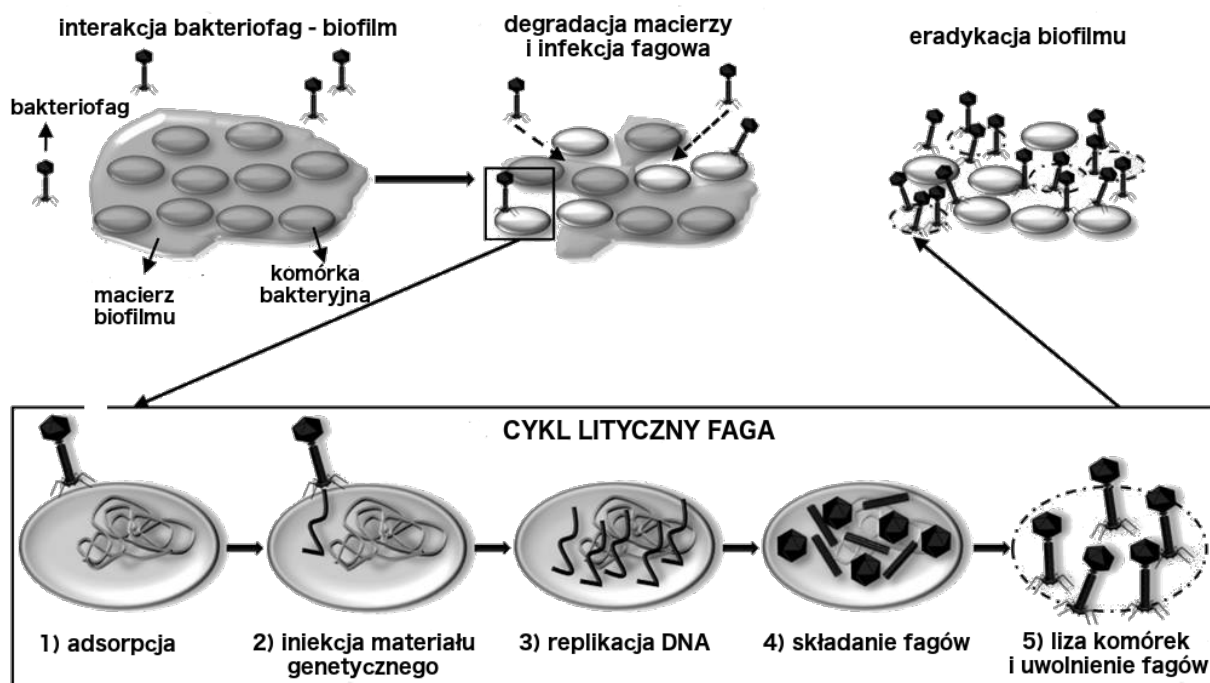
Działanie bakteriofagów na komórki drobnoustroju tworzące biofilm znacznie różni się od działania substancji chemicznych, w tym antybiotyków. Istnieją co najmniej trzy mechanizmy leżące u podstaw tej różnicy. Jednym z nich jest replikacja bakteriofagów w komórkach bakterii, która miejscowo zwiększa ich liczbę. Po rozpadzie komórki bakteryjnej, nowe cząstki faga rozprzestrzeniają się w strukturze biofilmu i eliminując kolejne komórki bakteryjne stopniowo usuwają biofilm oraz zmniejszają jego potencjał regeneracyjny [17].

Inny mechanizm wpływu fagów na strukturę biofilmu jest oparty na działaniu depolimeraz, które niszczą integralność EPS pozwalając cząstkom faga na uzyskanie dostępu do ukrytych w głębi biofilmu komórek bakteryjnych. Bakterie stają się wówczas bardziej podatne na działanie antybiotyków lub naturalnych mechanizmów obronnych gospodarza. Rola bakteriofagów polega na przenoszeniu genów depolimeraz lub indukowaniu ich ekspresji w komórce zaatakowanej bakterii [13]. Synteza depolimeraz przez bakteriofagi nie jest powszechnym zjawiskiem. Możliwe są jednak modyfikacje genetyczne fagów, pozwalające na wprowadzenie genów kodujących do genomu bakteriofaga. Lu i Collins [25], z użyciem faga T7, który dzięki technikom inżynierii genetycznej nabył zdolność ekspresji genu kodującego dyspersynę B (*dspB*), osiągnęli 100-krotnie bardziej skuteczną eradykację biofilmu bakteryjnego niż w przypadku faga T7 niezawierającego tego genu. Dyspersyna jest enzymem hydrolizującym wiązanie  $\beta$ -1,6-N-acetylo-D-glukozaminy – jednego z głównych składników EPS.

Zdolność bakteriofagów do infekowania komórek „persister” (przetrwałych) jest innym mechanizmem prowadzącym do eradykacji biofilmu. Ze względu na brak aktywności metabolicznej, w komórkach „persister” nie zachodzi replikacja fagów, a degradacja komórek przetrwałych nie jest możliwa bezpośrednio po infekcji. W chwili przywrócenia funkcji życiowych, w komórkach bakteryjnych dochodzi do ekspresji genów faga, a następnie lizy bakterii [17]. Na przykładzie *E. coli* i faga  $\lambda$  wykazano, że komórki „persister” są chronione przed eliminacją przez faga do czasu uaktywnienia swojego metabolizmu. Dochodzi wówczas do ekspresji genów faga kodujących funkcje lityczne, co ostatecznie powoduje lizę komórki bakteryjnej [33].

## HAMOWANIE PROCESU TWORZENIA BIOFILMU

Jedną ze strategii walki z biofilmem za pomocą bakteriofagów jest blokowanie początkowych etapów jego two-



**Ryc. 1.** Cykl lityczny bakteriofagów w biofilmie. 1) Adsorpcja faga do powierzchni komórki bakterii. Fag przyłącza się do specyficznych receptorów na powierzchni komórki za pośrednictwem włókien ogonka. 2) Iniekcja materiału genetycznego do cytoplazmy bakterii. 3) Replikacja genomu faga. Ekspresja genów wczesnych, regulujących metabolizm bakterii – „przeprogramowanie” na namnażanie fagów. 4) Formowanie nowych wirionów poprzez ekspresję genów późnych, składanie główek i ogonka, pakowanie kwasu nukleinowego do główek i dojrzewanie wirionów. 5) Liza komórki bakteryjnej i uwolnienie nowych fagów zdolnych do infekowania kolejnych komórek bakteryjnych w biofilmie i inicjacji kolejnego cyklu. (na podstawie [14] zmodyfikowano)

rzenia [32]. Aby zapobiec adhezji i rozwojowi biofilmu, dany materiał można poddać preinkubacji w roztworze fagów lub pokryć dodatkową warstwą zawierającą bakteriofagi.

Badania takie były prowadzone przez Curtina i Donlana [8], którzy wprowadzili aktywnego wobec *Staphylococcus epidermidis* bakteriofaga do hydrożelowej powłoki cewnika. W ciągu 24 h uzyskali znaczącą redukcję biofilmu w warunkach *in vitro* ( $p = 0,001$ ), wynikającą ze zmniejszenia liczby żywych komórek. Dzięki technice SEM (scanning electron microscope) wykazali również redukcję komórek ulegających adhezji do cewnika.

Podobne badanie, lecz z wykorzystaniem płytek mikrotitracyjnych przeprowadzili Kelly i wsp. [21]. Użyli bakteriofagi: K i jego pochodne oraz bioluminescencyjny szczep *S. aureus*-Xen29 (zawierający zintegrowany operon *lux*). Studzienki płytki inokulowali szczepem bakteryjnym oraz mieszaniną fagów, a następnie monitorowali ilościowo bioluminescencję szczepu bakteryjnego systemem IVIS Lumina. W studzienkach inokulowanych mieszaniną fagów nie zaobserwowali bioluminescencji wynikającej z obecności komórek bakteryjnych badanego szczepu. Barwienie 1% fioletem krystalicznym przeprowadzone dodatkowo po 48 h inkubacji, potwierdziło brak obecności biofilmu w studzienkach poddanych preinkubacji fagowej, podczas gdy w studzienkach kontrolnych niezawierających fagów zaobserwowano

silne wytwarzanie biofilmu. Badanie to wykazało skuteczność zastosowanego koktajlu fagowego w zapobieganiu tworzeniu biofilmu.

#### DEGRADOWANIE ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ MACIERZY BIOFILMU

Nieodzownym elementem biofilmu jest macierz zewnątrzkomórkowa (EPS). Tworzy znaczną część całkowitej masy biofilmu (60-90%) i może być barierą hamującą swobodną dyfuzję fagów, a przez to ograniczać ich przyłączanie do receptorów komórki gospodarza [47]. Zakażenie bakterii fagiem może nastąpić jedynie w przypadku zdolności faga do penetracji w głąb biofilmu, w wyniku dyfuzji lub dzięki obecności wytwarzanych przez siebie enzymów, głównie depolimeraz. Depolimerazy degradują macierz zewnątrzkomórkową i umożliwiają bakteriofagom kontakt z lipopolisacharydami, białkami błony zewnętrznej lub innymi receptorami na powierzchni komórki bakteryjnej, istotnymi w inicjacji cyklu litycznego [40]. Enzymy te są bardzo swoiste wobec konkretnego polisacharydu i nawet nieznaczne zmiany w jego składzie mogą zapobiec degradacji polimeru przez enzym. Zdarzają się wyjątki, w których jeden rodzaj depolimerazy trawi EPS wytworzony przez kilka odrębnych szczepów bakteryjnych. Jest to związane z obecnością blisko spokrewnionych bakterii, które mogą wytwarzać materiał zewnątrzkomórkowy nieróżniący się znacząco lub identyczny [17]. Jako przykład może posłużyć dyspersyna B (DspB), enzym wytwarzany

przez *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Redukuje biofilm kilku różnych gatunków bakterii, w tym *Staphylococcus* i *E. coli*, dzięki hydrolizie polimeru  $\beta$ -(1-6)-N-acetylo-D-glukozaminy (PIA/PNAG), podstawowego dla formowania biofilmu [19].

Wpływem bakteriofagów na degradację biofilmu klinicznych izolatów *S. aureus* zajmowali się Alves i wsp. [3]. Wykazali, że zawiesina faga K oraz nowo odkrytego, polivalentnego faga DRA88 znacząco zmniejszyła całkowitą masę biofilmów wytworzonych przez trzy różne izolaty *S. aureus* na powierzchni mikrotitracyjnej, polistyrenowej płytki. Jednocześnie autorzy zauważyli, że traktowanie biofilmów zawiesinami fagów przy wyższym MOI (multiplicity of infection) powodowało jedynie szybszą redukcją biofilmu, przy zachowaniu podobnego efektu końcowego (MOI 1 oraz 10).

Eradykacja biofilmu przez bakteriofagi może być wzmocniona przez zastosowanie adiuwantów, które zwiększają przepuszczalność macierzy i ekspozycję fagów na większą liczbę receptorów. Abdulamir i wsp. [1] wykazali, że zastosowanie fagów z dodatkiem 0,08% chlorku benzetonowego w przypadku biofilmów PIA-zależnych i 0,06% etanolu w białkowych biofilmach FnBPA-zależnych, spowodowało 100% zniszczenie biofilmów wytworzonych przez szczepy MSSA i około 78% biofilmów gronkowców MRSA [1].

Drilling i wsp. [12], wykorzystując zestaw Live/Dead Bac Light w połączeniu z mikroskopią konfokalną i komputerową analizą obrazu, oceniali skuteczność redukcji biofilmu *S. aureus* izolowanych od pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych przez mieszaniny czterech fagów należących do rodziny *Myoviridae*. Wykazali istotną redukcję masy biofilmu u czterech z pięciu badanych izolatów. Jednocześnie nastąpił znaczny wzrost miana faga po 24 i 48 h, co sugeruje, że obecne w mieszaninie fagi mają zdolność do przenikania przez biofilm, infekowania komórek i replikowania.

## PIŚMIENICTWO

[1] Abdulamir A.S., Jassim S.A., Hafidh R.R., Bakar F.A.: The potential of bacteriophage cocktail in eliminating Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in terms of different extracellular matrices expressed by PIA, *ciaA-D* and *FnBPA* genes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2015; 14: 49

[2] Ackermann H.W.: 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.*, 2007; 152: 227-243

[3] Alves D.R., Gaudion A., Bean J.E., Perez Esteban P., Arnot T.C., Harper D.R., Kot W., Hansen L.H., Enright M.C., Jenkins A.T.: Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014; 80: 6694-6703

[4] Beenken K.E., Dunman P.M., McAleese F., Macapagal D., Murphy E., Projan S.J., Blevins J.S., Smeltzer M.S.: Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 4665-4684

[5] Boles B.R., Horswill A.R.: Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000052

Nieliczne badania eradykacji przez bakteriofagi biofilmu *S. aureus* wykorzystują model *in vivo*. Seth i wsp. [38] w tym celu badali rany skórne w obrębie uszu królików zainfekowanych dzikim wariantem szczepu *S. aureus* oraz szczepem zmutowanym, ze zmniejszoną zdolnością do tworzenia biofilmu. Zwierzęta z ranami zakażonymi dzikim szczepem podzielono na 4 grupy, z których pierwsza była traktowana bakteriofagami, w drugiej rany oczyszczano chirurgicznie. W trzeciej grupie na chirurgicznie oczyszczone rany zaaplikowano bakteriofagi. Natomiast czwartą grupę tworzyły zwierzęta nieleczone. W wyniku przeprowadzonych badań wykazali, że zastosowanie obydwu metod: chirurgicznego oczyszczenia rany i miejscowego podania bakteriofagów znacznie poprawia mierzone parametry: zarówno gojenia ran (ilość nowej tkanki ziarninowej i naskórka;  $p < 0,05$ ), jak i zmniejszenia liczby bakterii ( $p < 0,03$ ), co potwierdzono skaningowym mikroskopem elektronowym. W przypadku ran zakażonych zmutowanym szczepem *S. aureus*, niezdolnym do tworzenia biofilmu, już tylko miejscowe podawanie bakteriofaga znacznie zmniejszyło liczbę żywych bakterii ( $p < 0,0001$ ) oraz poprawiło parametry procesu gojenia. Dzięki temu autorzy potwierdzili, że terapia bakteriofagowa może być skuteczną metodą leczenia ran, na których utworzył się biofilm bakteryjny w warunkach, gdy struktura EPS będzie defektywna (z powodu mutacji) lub zostanie zaburzona (przy oczyszczaniu rany).

## PODSUMOWANIE

Jak wykazały liczne badania *in vitro*, bakteriofagi są zdolne zarówno do zapobiegania tworzeniu się biofilmu, jak i do eliminacji bakterii z dojrzałych jego struktur. Dużą rolę przypisuje się wytwarzanym przez niektóre bakteriofagi depolimerazom, które ułatwiają im przenikanie do wewnętrznych warstw, jednocześnie naruszając strukturę biofilmu. W erze narastającej antybiotykooporności zastosowanie bakteriofagów może się stać nową strategią w zapobieganiu powstawania i zwalczaniu biofilmów.

[6] Brady R.A., Leid J.G., Kofonow J., Costerton J.W., Shirtliff M.E.: Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 6612-6619

[7] Carlton R.M.: Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999; 47: 267-274

[8] Curtin J.J., Donlan R.M.: Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006; 50: 1268-1275

[9] Curtright A.J., Abedon S.T.: Phage therapy: emergent property pharmacology. *J. Bioanal. Biomed.*, 2011; S6: 002

[10] DeLancey Pulcini E.: Bacterial biofilms: a review of current research. *Nephrologie*, 2001; 22: 439-441

[11] Donlan R.M.: Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002; 8: 881-890

- [12] Drilling A., Morales S., Jardeleza C., Vreugde S., Speck P., Wormald P.J.: Bacteriophage reduces biofilm of *Staphylococcus aureus* ex vivo isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014; 28: 3-11
- [13] Drulis-Kawa Z., Majkowska-Skrobek G., Maciejewska B., Delatre A.S., Lavigne R.: Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012; 13: 699-722
- [14] Gutiérrez D., Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Rodríguez A., García P.: Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.*, 2016; 7: 825
- [15] Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004; 2: 95-108
- [16] Hanlon G.W.: Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007; 30: 118-128
- [17] Harper D.R., Parracho H.M., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S.: Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 2014; 3: 270-284
- [18] Højby N., Ciofu O., Johansen H.K., Song Z.J., Moser C., Jensen P.Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T.: The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.*, 2011; 3: 55-65
- [19] Itoh Y., Wang X., Hinnebusch B.J., Preston J.F.3rd, Romeo T.: Depolymerization of  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 382-387
- [20] Johnson P.J., Levin B.R.: Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet.*, 2013; 9: e1003123
- [21] Kelly D., McAuliffe O., Ross R.P., Coffey A.: Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2012; 54: 286-291
- [22] Kuthan R.T., Łuczak M., Młynarczyk G.: Wytwarzanie biofilmu przez metacyclino-oporne szczepy *Staphylococcus aureus*. *Postępy Nauk Med.*, 2011; 10: 862-868
- [23] Lister J.L., Horswill A.R.: *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014; 4: 178
- [24] Loc-Carrillo C., Abedon S.T.: Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 2011; 1: 111-114
- [25] Lu T.K., Collins J.J.: Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 11197-11202
- [26] Marcinkiewicz J., Strus M., Pasich E.: Antibiotic resistance: a "dark side" of biofilm-associated chronic infections. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2013; 123: 309-313
- [27] McCarthy H., Rudkin J.K., Black N.S., Gallagher L., O'Neill E., O'Gara J.P.: Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015; 5: 1
- [28] Międzybrodzki R., Borysowski J., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne. *Kardiokirurgia i Torakochirurgia Pol.*, 2006; 3: 201-205
- [29] Möker N., Dean C.R., Tao J.: *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J. Bacteriol.*, 2010; 192: 1946-1955
- [30] Nilsson A.S.: Phage therapy - constraints and possibilities. *Ups. J. Med. Sci.*, 2014; 119: 192-198
- [31] O'Neill E., Pozzi C., Houston P., Smyth D., Humphreys H., Robinson D.A., O'Gara J.P.: Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 1379-1388
- [32] Parasion S., Kwiatek M., Gryko R., Mizak L., Malm A.: Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Pol. J. Microbiol.*, 2014; 63: 137-145
- [33] Pearl S., Gabay C., Kishony R., Oppenheim A., Balaban N.Q.: Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biol.*, 2008; 6: e120
- [34] Pozzi C., Waters E.M., Rudkin J.K., Schaeffer C.R., Lohan A.J., Tong P., Loftus B.J., Pier G.B., Fey P.D., Massey R.C., O'Gara J.P.: Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog.*, 2012; 8: e1002626
- [35] Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.*, 2015; 7: 493-512
- [36] Rani S.A., Pitts B., Beyenal H., Veluchamy R.A., Lewandowski Z., Davison W.M., Buckingham-meyer K., Stewart P.S.: Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 4223-4233
- [37] Sanchez C.J.Jr., Mende K., Beckius M.L., Akers K.S., Romano D.R., Wenke J.C., Murray C.K.: Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.*, 2013; 13: 47
- [38] Seth A.K., Geringer M.R., Nguyen K.T., Agnew S.P., Dumanian Z., Galiano R.D., Leung K.P., Mustoe T.A., Hong S.J.: Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* biofilm-infected wounds: a new approach to chronic wound care. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2013; 131: 225-234
- [39] Shah D., Zhang Z., Khodursky A., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K.: Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.*, 2006; 6: 53
- [40] Sillankorva S.M.: Use of bacteriophages to control biofilms. *Univ. do Minho Port.*, 2008; 1-179
- [41] Skurnik M., Strauch E.: Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006; 296: 5-14
- [42] Smith K., Perez A., Ramage G., Lappin D., Gemmell C.G., Lang S.: Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 2008; 57: 1018-1023
- [43] Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.Jr.: Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 649-659
- [44] Teitzel G.M., Parsek M.R.: Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 2313-2320
- [45] Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G.Jr.: *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015; 28: 603-661
- [46] Torotonda M.P., Manna A.C., Cheung A.L., Lasa I., Penadés J.R.: SarA positively controls Bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 5790-5798
- [47] Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.: Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 2009; 14: 2535-2554

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.