

Утицај хидрофобности бета хемолитичког стрептокока групе А на процес приањања и стварање биофилма

Александра Шмитран¹, Татјана Марковић², Лазар Ранин³

¹Катедра за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Бањој Луци, Бања Лука, Република Српска;

²ЈЗУ Институт за јавно здравство, Бања Лука, Република Српска;

³Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Хидрофобност бактеријске ћелије и приањање (адхеренција) за супстрат су један од најважнијих фактора у настанку биофилма. Бета хемолитички стрептокок групе А се убрја у слабе и нестабилне произвођаче биофилма, чија улога у патогенези стрептококних болести још није разјашњена.

Циљ рада Циљ овог рада је био да се утврди утицај хидрофобности и приањања на стварање биофилма инвазивних и неинвазивних изолата бета хемолитичког стрептокока групе А, те процени стабилност образовања биофилма у функцији времена.

Методе рада Приањање, хидрофобност и стварање биофилма су испитани за 172 изолата која су сврстана у три групе: неинвазивни, слабо инвазивни и инвазивни изолати. Приањање за необложену микротитарску плочу и микротитарску плочу обложу ламинином, као и стварање биофилма током 12, 24 и 48 сати инкубације, испитани су методом Степановића и сарадника. Хидрофобност је испитана *MATH* тестом по Розенбергу (*Rosenberg*), односно *SAT* тестом по Линдалу (*Lindhal*).

Резултати У групи неинвазивних изолата утврђена је повезаност приањања и стварања биофилма. Ови изолати су били стабилни произвођачи биофилма током сва три времена инкубације. У групама слабо инвазивних и инвазивних изолата није уочена статистичка повезаност између посматраних варијабли. Инвазивни изолати су били нестабилни произвођачи биофилма.

Закључак Код неинвазивних изолата, који су означени као стабилни произвођачи биофилма, уочена је директна повезаност приањања и настанка биофилма, док је утицај хидрофобности на стварање биофилма био негативан. Инвазивни изолати су нестабилни произвођачи биофилма и код њих није уочена повезаност приањања и хидрофобности и стварања биофилма.

Кључне речи: адхеренција; хидрофобност; биофилм; бета хемолитички стрептокок групе А

УВОД

Streptococcus pyogenes је један од најчешћих хуманих патогена који изазива широк спектар обољења, која се на основу патогенетских механизма настанка могу поделити на пиогене инфекције, токсемичне инфекције и постстрептококне секвеле [1]. Учесталост ових обољења се већ деценијама не смањује. Посебно забрињава пораст инциденције тешких инвазивних облика стрептококних болести – некротизирајућег фасциитиса, целулитиса, стрептококног токсичног шок-синдрома, с измењеним одликама у односу на ранији период [2].

Бета хемолитички стрептокок групе А (ГАС) сврстава се у слабе произвођаче биофилма. На основу досадашњих експеримената сматра се да би стварање биофилма могло утицати на настанак стрептококног клицноштва [3]. Такође, доказано је да су неинвазивни изолати бољи произвођачи биофилма од инвазивних изолата, као и изолати осетљиви на еритромицин од еритромицин-резистентних [4]. На основу ових радова може се закључити да је биофилм одговор ГАС на

неодговарајуће услове средине и да обезбеђује бактеријама преживљавање имунског одговора, односно доводи до неуспеха лечења инфекција изазваних бактеријама које су у условима *in vitro* осетљиве на антибиотике.

Да би дошло до стварања биофилма, најзначајнији корак је приањање (адхеренција) за подлогу [5]. Приањање је процес припајања ГАС за ћелије домаћина, након чега следе придруживање (агрегација) блиско постављених бактерија и стварање сигнала за прелазак у колективни начин живота, при којем бактерије добијају заштитни, полисахаридни матриксни омотач. Овај омотач не постоји код слободноживећих облика, а одговоран је за већину одбрамбених механизма којима бактерије у биофилму избегавају искорењивање (ерадикацију) с места инфекције [6]. Фактори који утичу на приањање су разноврсни и могу потицати од подлоге на којој се биофилм ствара, почетног слоја који облаже супстрат, хидродинамичких особина водене средине (ако се биофилм у њој ствара), те одлика средине и самих бактерија [7]. Уз приањање, хидрофобност бактерија представља другу битну особину која допри-

Correspondence to:

Aleksandra ŠMITRAN
Katedra za mikrobiologiju i
imunologiju
Medicinski fakultet
Univerzitet u Banjoj Luci
Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka
Republika Srpska
aleksandrasmitran@yahoo.com

носи настанку биофилма [6]. Бактерије помоћу хидрофобних сила – које се остварују између површинских протеина бактерија и рецептора на циљним ћелијама или на супстрату на вештачкој подлози – успостављају контакт с подлогом и превазилазе почетне одбојне силе. Поступци мерења приањања, хидрофобности и способности стварања биофилма значајно се разликују у описаним процедурама [8-13], те их је важно анализирати и стандардизовати за сваку врсту бактерија.

ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада је био да се утврди утицај хидрофобности и приањања на настанак биофилма инвазивних и неинвазивних изолата ГАС. Такође, анализирани су добијени резултати ради процене стабилност стварања биофилма у функцији времена.

МЕТОДЕ РАДА

Бактеријски изолати

У експерименталном делу рада су коришћена 172 изолата *S. pyogenes*, која су на основу клиничког стања особе од које су изоловани подељени у три групе. Прву (СК) групу чинило је 100 неинвазивних изолата од клицоноша, другу (СТ) групу 50 слабо инвазивних изолата – узрочника тонзилофарингитиса, док су трећу (СИ) групу чинила 22 инвазивна изолата која су изолована из крви особа с инвазивним инфекцијама. Неинвазивни и слабо инвазивни изолати од клицоноша били су из колекције сојева Медицинског факултета Универзитета у Београду прикупљени током 2011. и 2012. године. Инвазивни изолати су такође били из колекције сојева Медицинског факултета у Београду, али су сакупљани током 22 године.

Испитивање приањања за необложену микротитарску плочу и микротитарску плочу обложену ламинином

Ламинин (*Sigma-Aldrich*, САД) у концентрацији од 0,5 mg/ml је разређен у Хенксовом сланом раствору (*Sigma-Aldrich*, САД) до концентрације од 5 µg/ml. Према упутствима произвођача, у сваку рупицу микротитарске плоче је укапано по 75 µl разблаженог ламинина и инкубирано током два сата на температури од 37°C. Након тога плоче су испране три пута стерилним Хенксовим сланим раствором и коришћене у експерименту. Да би се утврдило има ли разлике између испитиваних група при постојању површинских протеина који везују ламинин, изолати су претходно третирани хијалуронидазом ради отклањања капсуле.

Испитивање приањања је вршено у пластичним плочама за микротитрацију (*Kartell*, Италија) у атмосферским условима, према методи Степановића

и сарадника [14], са модификацијом густине испитиваног инокулума, који је износио 10⁶ cfu/ml. Након инкубације, бактерије се фиксирају метанолом, затим боје генцијана љубичастом бојом, а боја ресуспендује сирћетном киселином у концентрацији од 33%. Оптичка густина (*OD*) ресуспендоване боје је очитана на аутоматизованом читачу *ICN Flow Titrek Multiscan Plus* на l од 570 nm. На основу оптичке густине негативних проба одређена је гранична вредност (*ODc*), која се израчунавала као средња вредност три негативне пробе увећана за три стандардне девијације. Изолати су означени као „неадхерентни“ ако је вредност *OD* била мања од *ODc* или једнаке вредности, а као „адхерентни“ ако је вредност *ODc* била мања од вредности *OD*.

Као позитивна проба коришћен је сој *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

Одређивање хидрофобности

Одређивање хидрофобности је рађено *MATH* тестом према методи Розенберга (*Rosenberg*) и сарадника [15] и *SAT* тестом према методи Линдала (*Lindhal*) и сарадника [16].

Испитивање хидрофобности према Розенберговој методи рађено је тзв. *MATH* тестом (енгл. *microbial adhesion to hydrocarbons*), одређивањем процента бактерија које су приањале за угљоводонике хексадекан и ксилен. Овим тестом се мери оптичка густина бактеријске суспензије пре (*A0*) и након додавања ксилена (*A1*), према формули: $[(A0-A1)/A0] \times 100$. Да би се отклонио утицај капсуле на везивање хексадекана, исти експеримент је поновљен после третмана бактерија хијалуронидазом (*Sigma-Aldrich*, САД) у концентрацији од пет јединица по милилитру бујонске културе.

SAT тест (енгл. *salt aggregation test*) је рађен методом „исољавања“ површинских протеина и заснива се на бактеријској преципитацији раствором амонијум-сулфата различите моларности, које су износиле од 0,008 M до 4 M. Раствор амонијум-сулфата највеће моларности којом је остварен видљиви преципитат сматран је вредношћу *SAT* теста. Што је мања моларност амонијум-сулфата којом је остварена видљива преципитација, односно вредност *SAT* теста, то је већа хидрофобност тестираног изолата.

Стварање биофилма

Испитивање стварања биофилма током 12, 24 и 48 часова рађено је према методи Степановића и сарадника [14], с модификацијом концентрације испитиваног инокулума који је износио 10⁶ cfu/ml. Изолати су означени као „непроизвођачи“ биофилма, те слаби, умерени и јаки „произвођачи“ на основу следећих односа вредности *OD* и *ODc*: $OD < ODc$ – непроизвођачи, $ODc < OD < 2 \times ODc$ – слаби произвођачи, $2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$ – умерени произвођачи и $4 \times ODc < OD$ – јаки произвођачи.

Статистичка обрада података

За обраду података коришћен је статистички програм *SPSS 20*. За утврђивање разлике у приањању, хидрофобности и стварању биофилма између група примењена је анализа варијансе. Као *post-hoc* тест коришћен је Бонферонијев тест. Утицај хидрофобности на процес приањања и настанак биофилма испитан је помоћу Пирсоновог теста. Сви резултати су сматрани статистички значајним ако је $p < 0,05$, а високо статистички значајним ако је $p < 0,01$.

РЕЗУЛТАТИ

Приањање за необложу микротитарску плочу и плочу обложу ламинином

Између испитиваних група није уочена статистички значајна разлика у приањању за необложу микротитарску плочу ($F=0,203$; $p=0,816$). Резултати су приказани у виду пропорције, односно као релативан број који показује део приањајућих изолата у односу на укупан број испитиваних изолата (Табела 1).

Кад је испитано приањање за ламинин, утврђена је статистички високо значајна разлика између група ($F=12,914$; $p \leq 0,001$), која је последица бољег приањања изолата СИ групе у односу на друге две групе ($p=0,019$; $p \leq 0,001$), као и бољег приањања изолата СК групе у односу на СТ групу ($p=0,002$). Резултати приањања инвазивних изолата приказани су у табели 1.

Испитивање хидрофобности

Хидрофобност бактерија је у првом тесту испитана преко процента везаног хексадекана, при чему изолати нису уопште везивали хексадекан. Према препорукама других аутора [17], изолати су третирани хијалуронидазом ради отклањања капсуле, која физички прекрива хидрофобне површинске адхезине. Тако третирано изолати све три групе су слабо везивали хексадекан и није уочена статистички значајна разлика између група (Табела 2). Након тога је, према препорукама других аутора [18], испитана хидрофобност помоћу ксилена (Табела 2). Изолати су одлично везивали ксилен, а након експеримента је уочена статистички значајна разлика између група, која је последица веће хидрофобности СК групе у односу на друге две ($p < 0,001$; $p=0,041$), као и веће хидрофобности СИ групе у односу на СТ групу ($p=0,044$).

Кад је испитана хидрофобност *SAT* тестом, није уочена статистички значајна разлика између група ($p=1,000$ у све три групе). За изолате СК групе просечна вредност *SAT* теста је била $0,11 M$, за изолате СТ групе $0,14 M$, а за изолате СИ групе $0,13 M$. Вредност теста у све три групе варијала је од $0,008 M$ до $2 M$, тј. изолати све три групе су преципитирали с амонијум-сулфатом моларности $0,008-2 M$.

Табела 1. Пропорција изолата који су приањали за необложу и микротитарску плочу обложу ламинином

Table 1. Proportion of adherent isolates to uncoated and laminin-coated microtiter plate

Пропорција Proportion	Приањање за необложу микротитарску плочу Adherence to uncoated microtiter plate	Приањање за микротитарску плочу обложу ламинином Adherence to laminin- coated microtiter plate
СК група NI group	0.53	2.24**
СТ група LI group	0.52	1.94
СИ група HI group	0.45	2.77*
<i>F</i>	0.203	12.914
<i>p</i>	0.816	≤ 0.001

* статистички значајна разлика између група; ** статистички високо значајна разлика између група

СК група – неинвазивни изолати од клицоноша; СТ група – слабо инвазивни изолати, узрочници тонзилофарингитиса; СИ група – инвазивни изолати изоловани из крви особа с инвазивним инфекцијама; *F* – вредност статистичког теста; *p* – вредност статистичке значајности

* significant difference between groups; ** highly significant difference between groups

NI – non-invasive isolates from streptococcal carriers; LI – low invasive isolates from patients with tonsillopharyngitis; HI – highly invasive isolates from patients with invasive diseases; *F* – value of statistical analysis; *p* – value of statistical significance

Табела 2. Хидрофобност изолата исказана вредношћу *MATH* теста

Хидрофобност Hydrophobicity	Вредност <i>MATH</i> теста Value of <i>MATH</i>	
	Хексадекан Hexadecane	Ксилен Xylene
СК група NI group	10.81%	48.49%**
СТ група LI group	9.02%	22.78%
СИ група HI group	11.68%	36.09%*
Укупно Total	10.40%	39.43%
<i>F</i>	0.504	25.006
<i>p</i>	0.605	≤ 0.001

* статистички значајна разлика између група; ** статистички високо значајна разлика између група

* significant difference between groups; ** highly significant difference between groups

Табела 3. Пропорција изолата *Streptococcus pyogenes* који стварају биофилм

Table 3. Proportion of biofilm producers of *Streptococcus pyogenes*

Пропорција Proportion	Инкубација Incubation		
	12 h	24 h	48 h
СК група NI group	0.29	0.17	0.36*
СТ група LI group	0.32	0.42**	0.34*
СИ група HI group	0.14	0.09	0.05
<i>F</i>	1.349	7.785	4.396
<i>p</i>	0.262	0.01	0.014

* статистички значајна разлика између група; ** статистички високо значајна разлика између група

* significant difference between groups; ** highly significant difference between groups

Стварање биофилма

Након 12-часовне инкубације није утврђена статистички значајна разлика између група ($p > 0,05$). Након 24-часовне инкубације уочена је статистички високо значајна разлика, јер је група СТ боље стварала биофилм у односу друге две групе изолата ($p = 0,002$; $p = 0,006$). Након 48-часовне инкубације уочена је статистички значајна разлика због боље производње биофилма изолата из група СК и СТ у односу на групу СИ ($p = 0,012$; $p = 0,038$). Резултати стварања биофилма приказани су у табели 3.

Испитивање утицаја различитих метода мерења приањања и хидрофобности на стварање биофилма

Анализом изолата СК групе уочена је негативна повезаност између хидрофобности мерене помоћу ксилена и настанка биофилма одређеног након 12 часова ($r = -0,236$; $p = 0,018$) и након 24 часа ($r = -0,201$; $p = 0,045$), тј. сојеви који боље везују ксилен били су слабији произвођачи биофилма. Такође, уочена је позитивна повезаност приањања изолата за необложену микротитарску плочу са настанком биофилма након 48 часова ($r = 0,205$; $p = 0,040$), тј. изолати који су боље приањали били су и бољи произвођачи биофилма након 48-часовне инкубације. У групи клицоноша уочена је статистички значајна повезаност између настанка биофилма након 12 часова и након 24 часа ($r = 0,166$; $p = 0,03$) и статистички високо значајна повезаност између стварања биофилма након 12 часова и 48 часова, тј. изолати који су стварали биофилм након 12 часова производили су га и након 24 часа и 48 часова ($r = 0,255$; $p = 0,001$). Није уочена повезаност настанка биофилма након 24 часа и након 48 часова. То показује да ГАС изолати нису стабилни произвођачи биофилма, већ да се биофилм ствара и разара у микротитарској плочи током времена, али да ће рани произвођачи биофилма стварати биофилм и касније.

Анализом узрочника тонзилофарингитиса, односно слабо инвазивних изолата СТ групе, није уочена повезаност приањања и хидрофобности са настанком биофилма током задатог времена трајања експеримента ($p > 0,05$). Уочена је статистички висока повезаност стварања биофилма након 24 часа и производње биофилма након 48 часова у овој групи сојева ($r = 0,501$; $p < 0,01$). У овој групи су касни произвођачи биофилма били стабилни произвођачи.

Анализом инвазивних изолата СИ групе није уочена повезаност приањања и хидрофобности са настанком биофилма током задатог времена трајања експеримента ($p > 0,05$). Није уочена ни повезаност настанка биофилма током експеримента, што указује на то да су ови сојеви изузетно нестабилни приликом стварања биофилма, тј. да се њихов биофилм током времена стално ствара и расипа.

ДИСКУСИЈА

Приањање бактерија за површину је најважнији корак за настанак инфекције, као и биофилма. Приањање (адхеренција) је динамичан процес који омогућава бактеријама да остану припојене за ћелије домаћина током одговарајућих услова средине (pH , оксидационо-редукциони потенцијал, ниво кисеоника и слично). Уколико услови средине нису одговарајући, стрептококе поседују ензиме помоћу којих разграђују рецепторе и одвајају се од ћелије домаћина [19].

Бета хемолитички стрептокок групе А (ГАС) као ретко која бактерија располаже разноврсним и многобројним адхезинима који му омогућавају ефикасно приањање за различите људске ћелије [20]. Способност стрептокока да се везују помоћу више различитих протеина доводи до отежане идентификације стрептококних адхезина. *S. pyogenes* припада групи бактерија које слабо приањају за вештачке материјале, тако да не доводи до настанка инфекција у вези с имплантима и протезама. Добијени резултати су у сагласности с тим и показују да не постоји разлика у приањању за необложену микротитарску плочу између три испитиване групе изолата. Било је занимљиво испитати да ли ће све три групе исто приањати за ламинин, протеин ванћелијског матрикса. Утврђено је да су за ламинин најбоље приањали инвазивни изолати (СИ група), затим изолати од клицоноша (СК група), а најлошије слабо инвазивни изолати изазивачи тонзилофарингитиса (СТ група). Све уочене разлике су биле статистички високо значајне. Ови резултати би се могли објаснити претпоставком да најбоље приањање остварују инвазивни сојеви и сојеви од клицоноша, јер располажу с више површинских адхезина или адхезинима већег афинитета, који доприносе патогенези стрептококних обољења. Инвазивним изолатима и изолатима од клицоноша неопходно је снажно приањање које им омогућава каснији продор у дубока ткива или настанак клицоноштва, док изазивачи тонзилофарингитиса као доминантан механизам у патогенези имају локалну упалну реакцију. На основу доступне литературе уочава се да се боље приањање инвазивних изолата за ламинин може објаснити већим степеном експримираности цистеин-протеазе (*SpeB*) [21]. Поред своје протеазне улоге, овај протеин је и одличан адхезин за ламинин [22]. Сви сојеви ГАС имају на хромозому ген за *SpeB*, али најбољу експресију овога гена показују инвазивни изолати [23, 24].

Приликом извођења *MATH* теста бактеријска суспензија се обавезно прави у пуферу чија је моларност већа од 150 mM, јер у таквим условима хидрофобне силе имају већу значајност у односу на електростатске силе. Према препоруци аутора за *MATH* тест [15], у нашем раду је коришћен тзв. *PUM* пуфер, који се састојао од фосфата, калијума, урее и магнезијума, моларности од 150 mM и вредности pH од 7,1. И поред овог, наши изолати су веома слабо везивали хексадекан, чак и након уклањања капсуле, према искуствима Офека (*Offek*)

и сарадника [17]. На основу експеримента Нагаоа (*Naga*) и сарадника [18], уместо хексадекана у извођење *MATH* теста смо укључили ксилен и изолати су показали значајно већу хидрофобност. Хексадекан је засићени алкан, који је слабо реактиван, а ксилен је незасићени ароматични алкен који је реактивнији од хексадекана. Ова разлика у грађи и разлике у поларизацији молекула су разлог слабијег везивања хексадекана. У нашем експерименту смо користећи ксилен успели да докажемо разлику у хидрофобности између група. Највећу хидрофобност су показали неинвазивни и инвазивни изолати, док су слабо инвазивни изолати имали најмању хидрофобност. Ови резултати су у складу с резултатима испитивања приањања за ламинин, је су у оба теста слабо инвазивни изолати показали најслабије резултате. Овим смо доказали нашу претпоставку да слабо инвазивним изолатима хидрофобност и ефикасно приањање нису најзначајнији патогенетски механизам, већ је то акутна запаљењска реакција.

Неинвазивни изолати од клицоноша су показали позитивну, тј. директну, повезаност приањања за необложено микротитарску плочу и касног настанка биофилма. Такође, ови изолати су се показали најстабилнијим произвођачима биофилма, што је у сагласности с најновијим претпоставкама да би стварање биофилма могло бити одговорно за настанак стрептококног клицоноштва [3]. Оно што донекле изненађује јесте податак о негативној повезаности хидрофобности мерење помоћу ксилена и стварања биофилма. У нашем раду смо показали да су мање хидрофобни изолати касније боље стварали биофилм. Ово се може објаснити чињеницом да ГАС поседује изузетно велики број површинских протеина који нису потпуно испитани и који на различите начине утичу на хидрофобност, приањање и каснију производњу биофилма. За М протеин и липотеихоинску киселину је доказано да имају највећи значај у хидрофобности стрептокока [25]. Коначном одговору и објашњењу нашег резултата значајно би допринела будућа М типизација испитаних изолата, као и одређивање количине липотеихоинске киселине у ћелијском зиду ових изолата.

Нашим истраживањем није пронађена повезаност ниједног начина мерења хидрофобности и приањања са стварањем биофилма за инвазивне и слабо инвазивне изолате. Такође, инвазивни изолати су се показали као изузетно нестабилни произвођачи биофилма, што све подржава налазе претходних експеримената којима је доказано да инвазивним изолатима стварање биофилма не представља битан фактор вируленције [4].

На основу доступне литературе и према нашим са знањима, ово је први рад који се бавио утврђивањем повезаности приањања, хидрофобности и настанка биофилма код ГАС. У досадашњим експериментима утврђена је корелација између хидрофобности бактерија и стварања биофилма код изолата *Stenotrop-*

homonas maltophilia, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* [26-29]. Такође, кад је поређена повезаност приањања и стварања биофилма, за изолате *Staphylococcus epidermidis* и *Acinetobacter baumannii* није утврђена директна корелација, што показује да добро приањање не води обавезно ка доброј производњи биофилма [30, 31]. Очигледно је да разнолики делови бактеријске ћелије на различит начин доприносе и приањању изолата и стварању биофилма, јер добро приањање и настанак биофилма нису фенотипске особине свих изолата, него су индивидуална особина сваког соја понаособ. С друге стране, увек треба напоменути да су и особине самог домаћина најчешће веома важне за настанак и развој обољења.

Битно је нагласити да су наши експерименти извођени у условима *in vitro*, те да би за коначно расветљавање улоге приањања, хидрофобности и стварања биофилма у патогенези стрептококних болести требало узети у обзир бројне интеракције разноврсних стрептококних адхезина с протеинима ванћелијског матрикса и ћелијама домаћина. С друге стране, управо захваљујући тако разноврсним и многобројним адхезинима стрептокок има способност одличног приањања које му омогућава настанак инфекција, од којих већина није толико озбиљна као што би требало да буду на основу разноврсних фактора вируленције којима ова бактерија располаже.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата се може закључити да су неинвазивни изолати стабилни произвођачи биофилма. Код неинвазивних изолата је уочена директна повезаност приањања и касније ефикасне производње биофилма, као и негативан утицај хидрофобности на стварање биофилма код бета хемолитичког стрептокока групе А. Ови подаци указују на то да је приањање значајнији предиктивни фактор у настанку биофилма од хидрофобност. С обзиром на то да су инвазивни изолати нестабилни произвођачи биофилма, није уочена веза између приањања и хидрофобности са настанком биофилма. Наши подаци, заједно с подацима других аутора, наводе на закључак да стварање биофилма није пресудан и значајан фактор вируленције у настанку инвазивних стрептококних болести.

НАПОМЕНА

Истраживање је урађено у оквиру пројекта „Бактерије резистентне на антибиотике у Србији: фенотипска и генотипска резистенција“ (број 175039), који је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:470-511.
- Stevens DL. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1995; 1:69-78.
- Ogawa T, Terao Y, Okuni H, Ninomiya K, Sakata H, Ikebe K, et al. Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb Pathog.* 2011; 51(1-2):58-68.
- Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E, et al. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2721-7.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284:1318-22.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:167-93.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9):881-90.
- Busscher H, Weerkamp A, van der Mei H, van Pelt A, De Jong H, Arends J. Measurement of the surface free-energy of bacterial-cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1984; 48:980-3.
- Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Hamelin J, Bernet N, Paul E, et al. Distribution and hydrophobic properties of extracellular polymeric substances in biofilms in relation towards cohesion. *J Biotechnol.* 2013; 165(2):85-92.
- Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res.* 2001; 80:363-70.
- Sanchez CJ, Shivshankar P, Stol K, Trakhtenbroit S, Sullam PM, Sauer K, et al. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intraspecies bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):e1001044.
- Jadoun J, Ozeri V, Burstein E, Skutelsky E, Hanski E, Sela S. Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis.* 1998; 178:147-58.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barret FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22:996-1006.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40(2):175-9.
- Rosenberg M, Gutnick E, Rosenberg M. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 1980; 9:29-33.
- Lindhal M, Faris A, Wadstrom T, Hjerten S. A new test based on „salting out“ to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 77:471-6.
- Offek I, Whitnack E, Beachey E. Hydrophobic interaction of Group A streptococci with hexadecane droplets. *J Bacteriol.* 1983; 154(1):139-45.
- Nagao PE, Benchetrit LC. Virulent and avirulent strains of group B Streptococci from Rio de Janeiro, Brazil. Relationship between differences in surface hydrophobicity, sialic acid content and macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(4):497-8.
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73(3):407-50.
- Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun.* 1992; 60:2147-52.
- Lukomski S, Burns EH Jr, Wyde PR, Podbielski A, Rurangirwa J, Moore-Poveda DK, et al. Genetic inactivation of an extracellular cysteine protease (SpeB) expressed by *Streptococcus pyogenes* decreases resistance to phagocytosis and dissemination to organs. *Infect Immun.* 1998; 66:771-6.
- Hytönen J, Haataja S, Gerlach D, Podbielski A, Finne J. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. *Mol Microbiol.* 2001; 39(2):512-9.
- Wheeler MC, Roe MH, Kaplan EL, Schlievert PM, Todd JK. Outbreak of group A streptococcus septicemia in children. Clinical, epidemiologic, and microbiological correlates. *JAMA.* 1991; 266(4):533-7.
- Talkington DF, Schwartz B, Black CM, Todd JK, Elliott J, Breiman RF, et al. Association of phenotypic and genotypic characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates with clinical components of streptococcal toxic shock syndrome. *Infect Immun.* 1993; 61(8):3369-74.
- Courtney HS, Ofek I, Penfound T, Nizet V, Pence MA, Kreikemeyer B, et al. Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS ONE.* 2009; 4(1):e4166.
- Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, Antonio DD, Savini V, Di Bonaventura G. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 287:41-7.
- Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 2004; 72:6132-8.
- Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D'Orio V, Vergara A, Conter M, et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol.* 2008; 104:1552-61.
- Ay S, Güldür T, Tekerekoğlu MS, Otlu B. Investigation of hydrophobic characteristics of biofilm producer and non-producer *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Mikrobiyol Bul.* 2010; 44(2):221-30.
- Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliviera R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res Microbiol.* 2005; 156(4):506-14.
- McQueary CN, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlation with other cell properties. *J Microbiol.* 2011; 49(2):243-50.

The Effect of Hydrophobicity of Group A Beta-Hemolytic Streptococcus in the Process of Adherence and Biofilm Production

Aleksandra Šmitran¹, Tatjana Marković², Lazar Ranin³

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Republic of Srpska;

²Public Health Institute, Banja Luka, Republic of Srpska;

³Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Introduction Bacterial cell hydrophobicity and adherence to a substrate are one of the most important factors in biofilm formation. Group A streptococcus is an unstable and low biofilm producer. Importance of biofilm production in streptococcal pathogenesis is still unknown.

Objective The aim of this study was to determine the impact of hydrophobicity and adherence on the biofilm production of group A streptococcal invasive and noninvasive isolates, and also to evaluate the stability of biofilm production in time function.

Methods Adherence, hydrophobicity and biofilm production were investigated in a total of 172 isolates divided into three groups: noninvasive, low invasive and highly invasive. Adherence to uncoated and laminin-coated microtiter plates and biofilm production after 12, 24 and 48 hours of incubation was determined using the method described by Stepanović et al. Hydrophobicity was measured using the MATH test by Rosenberg and SAT test by Lindhal.

Results Correlation between adherence and biofilm production was detected in the group of noninvasive isolates. These isolates were stable biofilm producers during all three time periods of biofilm production. In the groups of invasive and noninvasive isolates no statistical correlation was detected among the analysed variables. The invasive isolates were unstable biofilm producers.

Conclusion Noninvasive isolates were stable biofilm producers; as detected, they showed a direct correlation between adherence and biofilm production, and a negative impact of hydrophobicity on the biofilm production. Invasive isolates were unstable biofilm producers; it was observed that there was no correlation between adherence and hydrophobicity with biofilm production.

Keywords: adherence; hydrophobicity; biofilm; group A streptococcus

Примљен • Received: 18/07/2013

Прихваћен • Accepted: 22/11/2013