

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Magdalena Grela

**BADANIA NAD MOŻLIWOŚCIĄ TRANSLOKACJI
GRONKOWCÓW U CHORYCH PO URAZIE TERMICZNYM**

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. n.med. Małgorzata Bulanda

Pracę wykonano w Zakładzie Bakteriologii
Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz
w The Rowett Research Institute w Wielkiej Brytanii

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n. med. Piotr Heczko

KRAKÓW 2005

*Niniejszą pracę doktorską
poświęcam Moim Wspaniałym Rodzicom*

Składam serdeczne podziękowania mojej Pani Promotor – dr hab. n. med. Małgorzacie Bulandzie za okazaną pomoc, wsparcie, wyrozumiałość, życzliwość oraz cenne wskazówki i rady w trakcie wykonywania i pisania tej rozprawy doktorskiej.

I would like to thank specially my supervisor Dr Denise Kelly for help and scientific progress during my Marie-Curie fellowship in the Kellog Laboratory, Gut Microbiology and Immunology Division, the Rowett Research Institute in the United Kingdom.

Składam również podziękowania mgr Agnieszce Kucharskiej za okazaną pomoc w trakcie przeprowadzania doświadczeń oraz wszystkim pracownikom w Zakładzie Bakteriologii, Katedry Mikrobiologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za okazaną życzliwość i wsparcie podczas realizacji tej pracy.

Szczególne podziękowania składam Moim Rodzicom za ciągłe wsparcie, nieustająca wiarę i nieocenioną pomoc w trakcie całego doktoratu

oraz

pragnę podziękować mojemu przyjacielowi – Rysiowi za okazane serce i pomoc.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	4
1. Wstęp.....	7
1.1 Zakażenia szpitalne.....	7
1.1.1 Czynniki etiologiczne zakażeń szpitalnych.....	8
1.1.2 Zakażenia gronkowcowe.....	8
1.1.3 Mechanizmy zjadliwości <i>S. aureus</i>	9
1.1.4 Leczenie zakażeń gronkowcowych.....	11
1.1.5 Narastanie oporności szczepów MRSA na leki przeciwbakteryjne.....	12
1.1.6 Zakażenia krwi występujące u chorych po urazie termicznym.....	13
1.2 Translokacja bakteryjna.....	16
1.2.1 Zaburzenia składu ilościowego i jakościowego mikroflory jelitowej.....	18
1.2.2 Upośledzenie mechanizmów obronnych.....	18
1.2.3 Fizyczne uszkodzenie lub upośledzenie funkcji bariery śluzówkowej.....	19
1.2.4 Kombinacja procesów inicjujących proces translokacji.....	20
1.2.5 Czynniki sprzyjające translokacji bakteryjnej u ludzi.....	21
1.2.6 Mechanizmy obronne przed procesem translokacji.....	23
1.2.7 Badanie mechanizmu translokacji bakteryjnej.....	24
1.2.8 Translokacja bakteryjna i <i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.3 Udział cytokin w procesach obronnych organizmu.....	30
2. Założenie i cele pracy.....	33
3. Materiały i metody.....	35
3.1 Materiał do badań - szczepy bakteryjne.....	35
3.2 Charakterystyka szczepów izolowanych od chorych oparzonych – cechy fenotypowe.....	37
3.2.1 Hodowla i identyfikacja gatunku.....	37
3.2.2 Identyfikacja gronkowca złocistego.....	42
3.3 Charakterystyka szczepów gronkowcowych – cechy genotypowe.....	48
3.4 Hodowla komórek epitelialnych Caco-2 i endotelialnych NHDMEC.....	53
3.5 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym – typem dzikim (25923) i mutantem (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.....	56
3.6 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym – typem dzikim (25923) z ATCC w zależności od czasu trwania inkubacji.....	58
3.7 Izolacja RNA z komórek Caco-2 przy użyciu Clontech Nucleospin RNA II kit (BD Biosciences).....	59
3.8 Odwrotna transkrypcja (Reverse Transcription RT).....	63

3.9 Półilościowa, odwrotnie transkrybowana polimerazowa reakcja łańcuchowa (Semi- quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR...65	
3.10 Działanie bakteriobójcze gentamycyny i lisostafiny na wyselekcjonowane szczepy kliniczne.....70	70
3.11 Badanie adherencji i inwazji <i>Staphylococcus aureus</i> - typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC oraz <i>Salmonella enteritidis</i> na komórki Caco-2. Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S. aureus</i> na komórki epitelialne i endotelialne.....71	71
3.12 Badanie wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych – genistyny na inwazję <i>S. aureus</i> typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC oraz <i>S. enteritidis</i>73	73
3.13 Badanie translokacji bakteryjnej <i>S. aureus</i> : typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC i <i>S. enteritidis</i> oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.....74	74
4. Wyniki76	76
4.1 Analiza materiału.....76	76
4.2 Analiza fenotypowa szczepów.....79	79
4.3 Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA.....100	100
4.4 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym – typem dzikim (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.....117	117
4.5 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym – typem dzikim (25923) i mutantem (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.....142	142
4.6 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym – typem dzikim (25923) z ATCC w zależności od czasu trwania inkubacji.....160	160
4.7 Selekcja szczepów klinicznych.....175	175
4.8 Wyniki działania bakteriobójczego gentamycyny i lisostafiny na wyselekcjonowane szczepy kliniczne.....177	177
4.9 Ocena badania adherencji i inwazji <i>Staphylococcus aureus</i> - typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC oraz <i>Salmonella enteritidis</i> na komórki Caco-2. Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S. aureus</i> na komórki epitelialne i endotelialne.....181	181
4.10 Ocena badania wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych – genistyny na inwazję <i>S. aureus</i> typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC oraz <i>S. enteritidis</i>208	208

4.11 Ocena wyników badania translokacji bakteryjnej <i>S. aureus</i> : typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i <i>S. enteritidis</i> oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.....	211
5. Dyskusja	220
6. Wnioski	230
7. Streszczenie	232
7.1 Streszczenie w języku polskim.....	232
7.2 Streszczenie w języku angielskim.....	235
8. Literatura	238
Wykaz tabel.....	249
Wykaz rycin.....	255
Wykaz fotografii.....	260

Wykaz skrótów

- HAI – Hospital acquired infection – zakażenie nabyte w szpitalu
- TSST1 – Toxic Shock Syndrome Toxin 1, toksyna wstrząsu toksycznego 1
- ETA – toksyna epidermolityczna
- SSSS – staphylococcal scaled skin syndrome, zespół oparzonej skóry
- PBPs – penicillin binding proteins, białka wiążące penicylinę
- MSSA – metycillin sensitive *S. aureus*, gronkowce złociste metycylinowrażliwe
- MRSA – metycillin resistance *S. aureus*, gronkowce złociste metycylinooporne
- MSCNS – metycillin sensitive coagulase negative Staphylococcus, gronkowce koagulazo-ujemne metycylinowrażliwe
- MRCNS – metycillin resistance coagulase negative Staphylococcus, gronkowce koagulazo-ujemne metycylinooporne
- MOF, NWN – multiple organ failure, niewydolność wielonarządowa
- MLN – mesentric lymph-node, kręzkowy węzeł chłonny
- GALT – gut associated lymphoid tissue, tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego
- FAE – follicle-associated epithelium, nabłonek grudek chłonnych
- PFGE – pulsed field gel electrophoresis, elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym
- RFLP – restriction fragment length polymorphism, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
- CLOS – Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich
- OLO – Oddział Leczenia Oparzeń
- P – Oddział Leczenia Oparzeń Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie
- Rd – Oddział Leczenia Oparzeń i Chirurgii Plastycznej szpitala im. Rydygiera w Krakowie
- ATCC – American Type Culture Collection, Amerykańska Kolekcja Mikroorganizmów
- TSB – Tryptic Soy Broth, bulion trzustkowo-sojowy
- BHI – Brain Heart Infusion, bulion z wyciągiem z mózgu cielęcego i serca wołowego
- LB – Lowry-Broth, bulion Lowry
- CF – clumping factor, czynnik CF (koagulaza związana)
- NOV – nowobiocyna

MET – metycylina
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
E – erytromycyna
DA – klindamycyna
SXT – kotrimoksazol
CIP – ciprofloksacyna
GE – gentamycyna
VA – wankomacyna
TEC – teikoplanina
MUP – mupirocyna
RA – ryfampicyna
FD – kwas fusydynowy
TBE – Tris – boric acid-EDTA buffer, bufor Tris-kwas borowy
TAE – Tris – acetate – EDTA, bufor Tris-kwas octowy
PBS – phosphate-buffered saline, buforowany roztwór soli fizjologicznej
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Media
DTS – podłoże hodowlane bez antybiotyków, DMEM –Transferyna- Selenin sodu
FCS – Foetal Calf Serum, płodowa surowica cielęca
HBSS – Hanks Balanced Salt Solution
EGF – epidermal growth factor, epidermalny czynnik wzrostowy
CFU – colony forming units
OD – optical density
RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, odwrotnie transkrybowana polimerazowa reakcja łańcuchowa
MDB – Membrane Desalting Buffer
DEPC – diethyl pyrocarbonate
DTT – 1,4-Dithio-DL-threitol
PCR – Polymerase Chain Reaction, polimerazowa reakcja łańcuchowa
RT – Reverse Transcriptase, odwrotna transkrypcja
TNF – tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworów
MT – *S. aureus* mutant (10832) z ATCC
WT – *S. aureus*, typ dziki (25932) z ATCC
S1400 – *Salmonella enteritidis* z kolekcji Kellog Laboratory
SE – *Staphylococcus epidermidis*

SH – *Staphylococcus hominis*

R – rana

K – krew

O – odbył

R-K-O – rana-krew-odbył

R-K – rana-krew

K-O – krew-odbył

K_r ($R \neq K$) – szczep wyizolowany z rany jest niespokrewniony ze szczepem wyizolowanym z krwi, są różne pod względem genotypowym

K_i ($R=K$) szczepy wyizolowane z rany i krwi są identyczne pod względem genotypowym

o – odporny

w – wrażliwy

sw – średniowrażliwy

NB – nie badano

CC – confluent cells, stadium w hodowli komórkowej, w którym komórki stykają się ze sobą błonami komórkowymi i następuje agregacja komórkowa

PC – postconfluent cells, stadium w hodowli komórkowej, w którym komórki są po stadium CC (“confluent cells”)

PDGF – platelet-derived growth factor, płytkopochodny czynnik wzrostu

FGF – fibroblast growth factor, czynniki wzrostowy fibroblastów

TGF – Transforming growth factor, transformujący czynnik wzrostowy

GM-CSF – granulocyte macrophage-colony stimulation factor, czynnik tworzenia granulocytów i makrofagów

M-CSF – macrophage-colony stimulation factor, czynnik tworzenia kolonii makrofagów

G-CSF – granulocyte-colony stimulation factor, czynnik tworzenia kolonii granulocytów

VEGF – vascular endothelial growth factor, śródbłonkowy czynnik wzrostowy

1.WSTĘP

1.1 Zakażenia szpitalne

Zakażenia szpitalne są bardzo poważnym problemem współczesnej medycyny. Pacjenci podlegający hospitalizacji są narażeni na szereg czynników chorobotwórczych występujących w środowisku szpitalnym. W związku z tym, pojawiają się dalsze komplikacje wynikające z dodatkowego zakażenia, które powoduje przedłużenie leczenia i pobytu chorego w szpitalu (zwłaszcza na oddziałach intensywnej terapii), zbędne cierpienie, a także w najcięższych przypadkach nawet utratę życia. Postępujący rozwój medycyny stwarza szereg potencjalnych zagrożeń, poprzez zwiększenie zakresu i rozległości zabiegów chirurgicznych, transplantacją narządów, wszczepianiem implantów wprowadzenie coraz bardziej inwazyjnych metod diagnostycznych oraz stosowanie do badań i zabiegów trudnej do wyjałowienia aparatury mającej bezpośredni kontakt z jałowymi tkankami chorego. Dodatkowym problemem jest szerokie stosowanie antybiotykoterapii, która indukuje selekcję szczepów opornych na leki, mogących zdominować środowisko szpitalne (30, 94).

Pierwszym, który podał dającą się praktycznie zastosować definicję był Lowbury (88), który w 1981 roku zdefiniował zakażenie szpitalne następująco: “Zakażenie związane z pobytem chorego w szpitalu, które powstaje lub rozwija się w trakcie pobytu chorego w szpitalu (lub po opuszczeniu przezeń szpitala), rozpoznane klinicznie i potwierdzone laboratoryjnie jest zakażeniem szpitalnym niezależnie od tego czy czynnik etiologiczny, który je wywołał jest pochodzenia endogennego czy egzogennego” (30). Definicja Lowbury’ego okazała się zbyt ogólna, dlatego opracowano szereg nowych zasad i kryteriów pozwalających na bardziej precyzyjne określenie. Obecna definicja “zakażeń szpitalnych” określa to zjawisko jako: “Zakażenie nabyte w szpitalu” (Hospital acquired infection, HAI), czyli każde zakażenie, które nie występowało w formie jawnej, bądź w okresie inkubacji, w czasie przyjęcia chorego do szpitala. W miejsce jednej definicji dalej używa się wielu definicji dla poszczególnych form klinicznych zakażeń (Centers for Disease Control and Prevention Public Health Service USA). Modyfikowane do dziś stanowią one podstawę rozpoznawania zakażeń szpitalnych. Po adaptacji do warunków polskich, definicje te zostały opublikowane przez Polskie Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych (125).

Zakażenia szpitalne dzielimy na:

- zakażenia egzogenne- w których drobnoustroj pochodzi od innego chorego lub personelu, a także z rezerwuarów szpitalnych.
- zakażenia endogenne- wywołane przez własną mikroflorę chorego.

Zakażenia mogą się szerzyć na skutek bezpośredniego kontaktu ze źródłem i/lub rezerwuarem drobnoustrojów, drogą powietrzną, kropelkową lub pokarmową (151).

1.1.1 Czynniki etiologiczne zakażeń szpitalnych

Trudno jest wymienić wszystkie drobnoustroje, które mogą być przyczyną zakażeń szpitalnych, są wśród nich bakterie, grzyby, wirusy i pierwotniaki. W wielu opracowaniach najczęściej wymienianymi na oddziałach chirurgicznych są: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.*, gronkowce koagulazoujemne, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Na oddziałach intensywnej terapii przeważają koagulazoujemne gronkowce, w drugiej kolejności są paciorkowce kałowe, następnie drożdżopodobne grzyby, a wśród pałeczek jelitowych szczepy z rodzaju *Enterobacter*. Coraz częściej spotykanymi drobnoustrojami w zakażeniach szpitalnych są pałeczki rodzaju *Acinetobacter* (120).

Zakażenia gronkowcowe

Drobnoustroje rodzaju *Staphylococcus* są Gram-dodatnimi ziarenkowcami, skupiającymi się w charakterystyczne grona (grec. staphyle), które powstają na skutek podziałów komórek w wielu płaszczyznach.

Charakterystyczne cechy gronkowców to: są katalazododatnie, preferują warunki tlenowe, ale mogą żyć jako względne beztlenowce, rosną w obecności 7,5% chlorku sodu (71).

Do roku 1986 w rodzaju tym występowały tylko trzy gatunki: *S. aureus*, *S. epidermidis* i *S. saprophyticus*. Od tego roku znanych już było 19 gatunków zgodnie z taksonomią Bergey'a, a obecnie ten rodzaj zawiera aż 41 gatunków lub podgatunków (151).

Poszczególne gatunki rodzaju *Staphylococcus* mogą być podzielone na dwie podgrupy tj. wytwarzające koagulazę (wytrąca fibrynę z plazmy) lub nie posiadające tej właściwości. W pierwszej z nich znajduje się między innymi – *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, natomiast drugą grupę

stanowią gronkowce koagulazo-ujemne, z których najliczniej reprezentowany jest *Staphylococcus epidermidis* (73).

Głównym gatunkiem chorobotwórczym dla człowieka, który jest odpowiedzialny za wiele ciężkich zakażeń jest *Staphylococcus aureus*. Gronkowce koagulazo-ujemne stanowią prawidłową florę człowieka, jednakże mogą być one również przyczyną zakażeń szpitalnych. Dominującą pozycję zajmuje *Staphylococcus epidermidis* (44).

1.1.3 Mechanizmy zjadliwości *S.aureus*

Gronkowce mogą być przyczyną choroby wskutek zarówno zdolności do namnażania się i rozprzestrzeniania w tkankach, jak i wytwarzania w tkankach licznych substancji zewnątrzkomórkowych. Substancjami tymi są m. in. enzymy, toksyny, które są pod kontrolą genetyczną plazmidów lub mechanizm kontroli genetycznej nie jest jeszcze poznany.

Gronkowiec złocisty, *Staphylococcus aureus* jest jednym z najczęściej izolowanych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych jak i pozaszpitalnych (30).

Drobnoustrój ten ma wiele mechanizmów zjadliwości, inwazyjności i oporności, które powodują, że wywoływane przez niego zakażenia o ciężkim przebiegu są szczególnie niebezpieczne dla zdrowia i życia pacjenta (131).

Szczep gronkowca, zanim rozpocznie proces infekcyjny, musi połączyć się z receptorem powierzchniowym komórki docelowej gospodarza za pomocą tzw. adhezyn. *Staphylococcus aureus* posiada adhezyny, które reagują z licznymi białkami gospodarza, takimi jak: fibronektyna, fibrynogen, fibryna, kolagen, elastyna, laminina, witronektyna, trombostondyna, osteopontyna, sialoproteina tkanki kostnej i białka EMC (61).

Po związaniu się gronkowców z białkami gospodarza kolejnym etapem jest uszkodzenie komórek i tkanek, w którym biorą udział toksyny i enzymy wytwarzane przez gronkowca złocistego.

Tab. 1 Zewnątrzkomórkowe i komórkowe czynniki chorobotwórczości *S.aureus* (82).

Czynniki zewnątrzkomórkowe	Działanie
Hemolizyna alfa	Cytotoksyczne (erytrocyty, leukocyty, monocyty, makrofagi), dermonekrotyczna, kardiotoksyczna, letalna
Hemolizyny beta, delta, gamma	Cytotoksyczne (erytrocyty, leukocyty, monocyty, makrofagi), letalne
Leukocydyna	Cytotoksyczne (leukocyty, makrofagi)
Koagulaza	Krzepnięcie osocza na powierzchni komórki bakteryjnej – hamowanie fagocytozy i wokół ogniska zapalnego
Stafylokinaza (fibrynolizyna)	Rozpuszczanie skrzepów – ułatwienie rozprzestrzenianie
Hialuronidaza	Ułatwianie rozprzestrzenianie w tkankach
Nukleazy (DNA-zy i RNA-zy)	Rozkład DNA jąder komórkowych i RNA cytoplazmatycznego
Proteazy	Rozkład białek w tkankach
Toksyna epidermolityczna (eksfoliatyna) A- ciepłotała, B- ciepłochwiejna	Odszczepia warstwę ziarnistą naskórka tworząc pęcherze
Enterotoksyna (typy antygenowe: A, B, C, D, E)	Drażnienie ośrodka wymiotnego za pośrednictwem nerwu błędnego, zapalenie śluzówki i ogniska martwicy w jelicie
Toksyna zespołu wstrząsu toksycznego (Toxic Shock Syndrome Toxin 1, TSST1)	Gorączka, spadek ciśnienia krwi, wysypka, zaburzenia pracy płuc i nerek
Toksyna pirogenna (typy antygenowe: A i B)	Pirogenna, indukuje wysypkę na drodze nadwrażliwości
Czynniki komórkowe	Działanie
Białko A	Wiąże nieswoiście fragment F _c IgG uniemożliwiając jego przyleganie do receptora w błonie fagocyta – hamowanie fagocytozy
Otoczka	Hamuje fagocytozę
Peptydoglikan	Chemotaksja leukocytów, pirogenność
Kwas tejchojowy	Adhezja do kom. nabłonka błon śluzowych

Wśród egzotoksyn można wyróżnić (151, 89):

- Ø enterotoksyny – stanowiące grupę ciepłostabilnych białek odpowiedzialnych przede wszystkim za zatrucia pokarmowe
- Ø toksynę wstrząsu toksycznego (TSST-1 – toxic shock syndrome toxin -1) – wywołującą gorączkę, wstrząs i zaburzenia wielu układów
- Ø toksynę epidermolityczną (ETA) – powodującą uogólnione złuszczenie w przebiegu gronkowcowego zespołu oparzonej skóry (SSSS – staphylococcal scaled skin syndrome).

Kolejne czynniki zjadliwości i toksyny, które należą do grupy uszkodzających tkanki bezpośrednio w miejscu zakażenia to:

- Ø hemolizyny – powodujące lizę erytrocytów i uszkodzające krwinki płytkowe
- Ø leukocydyna – uszkodzająca leukocyty
- Ø proteaza, koagulaza, hialuronidaza, lipaza.

Koagulazoujemne gronkowce w porównaniu do gronkowca złocistego nie mają zdolności wytwarzania tak ogromnej liczby różnych toksyn i enzymów.

Wzrastająca liczba zakażeń gronkowcami, szczególnie gronkowcem skórnym, związana jest z bardzo dobrze rozwiniętą zdolnością do tworzenia kolonii na powierzchni białek wchodzących w skład skrzepliny, jak również na powierzchni tworzyw sztucznych, poza tym posiadają one zdolność do wytwarzania śluzu, który ułatwia im przytwierdzenie do powierzchni, a pokrywając bakterie, skutecznie utrudnia do nich dostęp antybiotyków i czynników odpornościowych (74).

Do innych istotnych czynników zjadliwości należy zdolność syntezy: hemolizyn (alfa i delta), stafylokinazy, dezoksyrybonukleazy, proteazy i lipazy (82).

1.1.4 Leczenie zakażeń gronkowcowych (120)

Jednym z lepiej poznanych mechanizmów oporności gronkowców na antybiotyki β -laktamowe jest produkcja β -laktamaz – enzymów hydrolizujących cząsteczkę antybiotyku zanim dotrze ona do miejsca receptorowego w ścianie komórkowej.

Przywrócenie aktywności tej grupy antybiotyków stało się możliwe dzięki:

- Ø otrzymaniu półsyntetycznych penicylin opornych na gronkowcowe β -laktamazy (metrylina, kloksacylina)
- Ø otrzymaniu nowych generacji (II i III) cefalosporyn stabilnych wobec niektórych β -laktamaz

Ø uzyskaniu preparatów zawierających inhibitory β -laktamaz (kw. klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam)

Skuteczność nowych generacji leków β -laktamowych nie trwała jednak długo.

Gronkowce wytworzyły nowy, niezależny od β -laktamaz typ oporności.

Genetyczną podstawą tego typu oporności są mutacje genów chromosomalnych kodujących białka wiążące penicyliny (PBPs – penicillin binding proteins), białka stanowiące miejsce receptorowe w ścianie komórkowej dla wszystkich antybiotyków β -laktamowych. Fenotypowa ekspresja mutacji to oporność na penicyliny, cefalosporyny i karbapanemy.

W związku z tym obowiązuje następujący podział gronkowców:

- Ø gronkowce złociste metycylinowrażliwe (MSSA – metycillin sensitive *S. aureus*)
- Ø gronkowce złociste metycylinooporne (MRSA – metycillin resistance *S. aureus*)
- Ø gronkowce koagulazoujemne metycylinowrażliwe (MSCNS– metycillin sensitive coagulase negative Staphylococcus)
- Ø gronkowce koagulazoujemne metycylinowrażliwe (MRCNS– metycillin resistance coagulase negative Staphylococcus).

1.1.5 Narastanie oporności szczepów MRSA na leki przeciwbakteryjne

Ze względu na powszechne stosowanie antybiotyków β -laktamowych w leczeniu otwartym i zamkniętym, szczepy metycylinooporne bardzo szybko rozprzestrzeniają się, szczególnie w środowisku szpitalnym.

Wśród szczepów metycylinoopornych obserwuje się narastanie oporności na inne grupy leków przeciwbakteryjnych, np. fluorochinolony.

Dlatego w przypadkach ciężkich zakażeń wieloopornymi szczepami gronkowcowymi coraz częściej stajemy wobec poważnego problemu terapeutycznego. Nierzadko okazuje się, że jedynymi skutecznymi lekami są antybiotyki glikopeptydowe tj. wankomycyna i teikoplanina.

Narastanie oporności obserwuje się również u pałeczek Gram-ujemnych na skutek powszechnego stosowania przez wiele lat aminoglikozydów. Doprowadziło to do selekcji szczepów opornych. Fluorochinolony były drugą grupą leków przeciwbakteryjnych, z którą wiązano nadzieję na skuteczną terapię zakażeń Gram-ujemnymi pałeczkami, lecz i tu po paru latach stosowania odsetek szczepów opornych na wszystkie preparaty tej grupy wzrósł znacznie.

Z klinicznego punktu widzenia , największym problemem jest rosnąca oporność Gram-ujemnych pałeczek na antybiotyki β -laktamowe.

Podsumowując problemy oporności szpitalnych szczepów bakterii na antybiotyki, należy stwierdzić, że:

- Ø nie ma dotychczas leku przeciwbakteryjnego, na który bakterie “nie znalazłyby sposobu”
- Ø nie wiemy, jakie możliwości kryją w sobie chromosomalne i pozachromosomalne geny bakteryjne
- Ø konieczne jest śledzenie i reagowanie na pojawienie się nowego typu oporności
- Ø niezwykle ważne jest prowadzenie racjonalnej polityki antybiotykowej w celu uniknięcia presji leku i selekcji nowych typów oporności (120).

Zakażenia krwi występujące u chorych po urazie termicznym

Zakażenia krwi są jedną z najcięższych form klinicznych zakażeń szpitalnych (33, 121).

Śmiertelność u chorych z zakażeniem łóżyska naczyniowego leczonych w oddziałach szpitalnych może sięgać od 20 do 50%. (33, 119) .W zakażeniach gronkowcowych śmiertelność sięga do 10%, w zakażeniach pałeczkami Gram-ujemnymi do 30%, a powodowane przez enterokoki aż do 35% (121) .

Zakażenia te są związane głównie z raną oparzeniową i leczeniem prowadzonym drogą dożylną przy zastosowaniu linii naczyniowych. Czynnikiem ryzyka zakażeń krwi u chorych oparzonych są między innymi: uraz, przeszczepy skóry, cewniki, translokacje bakteryjne oraz błędy w polityce antybiotykowej czyli standaryzacji i kontroli stosowanych metod leczenia (62, 86).

Przeprowadzono ostatnio badania, w których analizą objęto 455 chorych hospitalizowanych w 2002 roku w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (57), z tych samych od których pochodziły szczepy *S. aureus* wykorzystane jako model badawczy w niniejszej rozprawie.

Kryterium rozpoznania zakażenia krwi było następujące: gorączka powyżej 39°C, dreszcze, obniżone ciśnienie tętnicze poniżej 90 mmHg, leukocytoza powyżej 12000/mm³, izolacja drobnoustroju z krwi (125, 137). Gdy drobnoustrój wyizolowany z posiewu krwi był identyczny z drobnoustrojem izolowanym z rany oparzeniowej, to zakażenie krwi kwalifikowano jako wtórne zakażenie krwi (62).

U 149 chorych co stanowiło 32,7% wszystkich hospitalizowanych stwierdzono zakażenia krwi na podstawie objawów klinicznych. Na 725 posiewów tylko 188 było dodatnich czyli wyizolowano patogen, co stanowiło 25,9% wszystkich wykonanych badań. Tylko u 79 chorych co stanowiło 53% wszystkich pacjentów z klinicznymi objawami zakażenia łóżyska naczyniowego z krwi wyhodowano drobnoustrój. U 70 chorych co stanowiło 47% wszystkich pacjentów z klinicznymi objawami zakażenia krwi nie wykryto w łóżysku naczyniowym drobnoustrojów ani ich antygenów. Spośród 79 chorych, u których wyizolowano drobnoustrój z krwi, zastosowano racjonalną terapię antybiotykami, 49 pacjentów co stanowiło 62% zostało wyleczonych, a 30 zmarło co stanowi 38%.

Z przeprowadzonych badań mikrobiologicznych krwi u wszystkich pacjentów przejawiających kliniczne objawy zakażenia ogólnoustrojowego wyhodowano 62 szczepy *Staphylococcus aureus*. W obrębie tego gatunku 43 szczepy były metycylinooporne (MRSA), a tylko 19 szczepów było metycylinowrażliwych (MSSA). Te dwie bakterie stanowiły łącznie 30 % wszystkich drobnoustrojów izolowanych z krwi (Tab. 2) (57).

Drobnoustrój	Liczba szczepów	Udział procentowy (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	58	28,29
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	43	20,97
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	17,03
<i>Staphylococcus epidermidis MRSE</i>	25	12,19
<i>Staphylococcus aureus MSSA</i>	19	9,27
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	4,88
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	2,93
<i>Escherichia coli</i>	5	2,44
<i>Candida albicans</i>	4	1,95
Razem	205	100

Tab. 2 Czynniki etiologiczne zakażeń krwi występujących u chorych oparzonych hospitalizowanych w 2002 roku (57).

Kolejnym drobnoustrojem licznie wyizolowanym z krwi chorych oparzonych było 58 szczepów *Acinetobacter baumannii*. Pałeczki te charakteryzowały się licznymi mechanizmami oporności i niewrażliwością na powszechnie stosowane antybiotyki,

dlatego stanowiły najważniejszy czynnik etiologiczny (33,3%) zakażeń krwi w grupie pacjentów oparzonych, którzy zmarli. Śmiertelność z powodu zakażenia łożyska naczyniowego pałeczkami Gram-ujemnymi *Acinetobacter baumannii* (29 szczepów) i *Pseudomonas aeruginosa* (14 szczepów) u chorych oparzonych należy do najwyższych, łącznie 43 szczepy, co stanowi prawie 50% tej grupy (Tab. 3).

Drobnoustrój	Liczba szczepów	Udział procentowy (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	29	33,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	16,1
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	14	16,1
<i>Staphylococcus aureus MSSA</i>	8	9,1
<i>Staphylococcus epidermidis MRSA</i>	8	9,1
<i>Escherichia coli</i>	5	5,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	5,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3,5
<i>Candida albicans</i>	1	1,2
Razem	87	100

Tab. 3 Czynniki etiologiczne zakażeń krwi u chorych oparzonych, którzy zmarli w 2002 roku (57).

U wyleczonych pacjentów najczęściej izolowanym czynnikiem etiologicznym zakażenia łożyska naczyniowego było 40 szczepów *Staphylococcus aureus*, co stanowi 43% wszystkich izolowanych szczepów w tej grupie chorych (Tab.4).

Drobnoustrój	Liczba szczepów	Udział procentowy (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	29	24,6
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i>	29	24,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	17,8
<i>Staphylococcus epidermidis MRSE</i>	17	14,4
<i>Staphylococcus aureus MSSA</i>	11	9,32
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	4,24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2,54

Drobnoustroj	Liczba szczepów	Udział procentowy (%)
<i>Candida albicans</i>	3	2,54
Razem	118	100

Tab. 4 Czynniki etiologiczne zakażeń krwi u chorych oparzonych, którzy zostali wyleczeni w 2002r. (57).

Z powyższych badań wynika, że zakażenia krwi spowodowane są najczęściej przez *Staphylococcus aureus*. Szczepy MRSA i MSSA stanowiły 30% wszystkich drobnoustrojów izolowanych z krwi, z tego MRSA stanowiły większość.

Spośród 43 szczepów metycylooopornych wyizolowanych z krwi, 14 z nich wywołało zakażenie o skutku śmiertelnym, a wobec 29 szczepów u pozostałych pacjentów udało się zastosować odpowiednią antybiotykoterapię.

Gronkowiec metycyloooporny jest jednym z najgroźniejszych patogenów zagrażającym życiu pacjenta, jest na drugim miejscu po pałeczce *Acinetobacter baumannii*.

1.2 Translokacja bakteryjna

Na problem translokacji zwrócono uwagę dopiero w ostatnich latach zastanawiając się nad dużą umieralnością pacjentów w stanie krytycznym na oddziałach intensywnej terapii lub pooperacyjnych i stwierdzając u nich niewydolność wielonarządową (NWN, MOF- multiple organ failure). Obraz kliniczny jest podobny do zakażenia uogólnionego, ale jest wywołany przez endotoksyny przechodzące ze światła jelita i dlatego najczęściej nie udaje się wyizolować czynnika infekcyjnego (3, 10, 13, 39, 40, 42). Zjawisko to tłumaczy translokacja bakteryjna.

Po raz pierwszy termin translokacja został użyty przez Wołochowa i in. w 1966 roku (149) i oznaczał on przechodzenie bakterii przez ścianę jelita. Następnie definicja translokacji bakteryjnej została zmodyfikowana przez Berga i in. Sprecyzowali oni, jakie bakterie ulegają translokacji i jakie są jej kolejne etapy. Translokacja bakteryjna wg nich to przejście żywych bakterii przez śluzówkę jelit do krezkowych węzłów chłonnych oraz innych narządów (19, 52, 142) i w ostateczności do krwiobiegu (16). Współczesna definicja translokacji bakteryjnej również uległa pewnej modyfikacji przez C. Wells, która określiła to zjawisko jako przejście bakterii zarówno żywych jak

i martwych oraz ich produktów (takich jak: egzotoksyny, endotoksyny i fragmenty ściany komórkowej) poza światło jelita (147).

Translokacja bakteryjna jest jedną z przyczyn zakażeń endogennych, które są rezultatem zaburzenia w składzie ilościowym lub jakościowym mikroflory pacjenta, a także jej funkcjonowaniu.

Zaburzenie składu ilościowego i jakościowego naturalnej flory jelitowej (np. przerost bakterii Gram (-)) jest również czynnikiem inicjującym czy predysponującym do rozpoczęcia translokacji bakteryjnej (20, 21). Pozostałe czynniki to: upośledzenie mechanizmów obronnych i fizyczne uszkodzenie lub upośledzenie funkcji bariery śluzówkowej (6, 22, 24, 27, 41, 43, 84, 107, 130, 133, 136, 138, 139, 143, 146).

Tab. 5 Czynniki inicjujące proces translokacji bakteryjnej – model zwierzęcy (15).

Czynniki inicjujące	Skutek
Podawanie doustnie antybiotyków	Zaburzenie składu ilościowego i jakościowego mikroflory jelitowej
Głodzenie	
Hipoproteinemia (36)	
Odżywienie parenteralne	
Obstrukcja	
Podwiązanie przewodów żółciowych	
Zamknięcie światła jelita	
Iniekcja leków immunosupresyjnych	Upośledzenie mechanizmów obronnych
Usunięcie grasicy (112, 113)	
Chłoniak	
Białaczka (115)	
Endotoksemia (38)	
Oparzenie (95, 96)	
Wstrząs krwotoczny	
Oparzenie	Fizyczne uszkodzenie lub upośledzenie funkcjonalne śluzówki
Endotoksemia	
Iniekcja zymosanu	
Podanie oleju rycynowego	
Wstrząs krwotoczny	

1.2.1 Zaburzenie składu ilościowego i jakościowego mikroflory jelitowej.

Zazwyczaj zaburzenie to następuje poprzez przerost pałeczek Gram (-) z flory jelitowej (Enterobacteriaceae) lub następuje kolonizacja pałeczkami Gram (-) z flory szpitalnej np. *Pseudomonas aeruginosa*.

Nie wszystkie gatunki z rodziny Enterobacteriaceae translokują do krezkowych węzłów chłonnych (mesentric-lymph-node complex - MLN) z jednakową efektywnością (138).

Do bakterii, które z największą efektywnością przemieszczają się do MLN u gnotobiotycznych myszy można zaliczyć bakterie w następującej kolejności: *Pseudomonas aeruginosa* oraz względne beztlenowce z rodziny Enterobacteriaceae takie jak: *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, i *Proteus mirabilis*; następnie średnią efektywnością charakteryzują się bakterie Gram (+), preferujące warunki tlenowe takie jak *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus brevis*. Bezwzględne beztlenowce takie jak: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* i *Fusobacterium russii* są najmniej efektywne w translokacji bakteryjnej, mimo ich ogromnej ilości w przewodzie pokarmowym – 10^{10} - 10^{11} /g (15).

Bakterie, które ulegają translokacji pokonują barierę epitelialną przez komórki nabłonkowe (penetracja transcelularna) lub pomiędzy komórkami (penetracja paracelularna) (15, 17, 18, 31).

Jeżeli dochodzi do penetracji transcelularnej - przez komórki nabłonkowe, bakterie dostają się do krążenia limfatycznego, następnie do MLN i do innych organów.

Drugi sposób penetracji powoduje natomiast dostanie się bakterii do naczyń krwionośnych, do wątroby i następnie do krwioobiegu (15).

Czynniki które sprzyjają zaburzeniu mikroflory jelitowej to: antybiotykoterapia, odżywianie parenteralne (15), niedokrwienie krezkowe, wstrząs krwotoczny, rany oparzeniowe i inne urazy, zabieg operacyjny, niedrożność jelit, immunosupresja (15, 134).

1.2.2 Upośledzenie mechanizmów obronnych

Model zwierzęcy potwierdził teorie, że po pokonaniu bariery epitelialnej jelit, bakterie dostają się do krezkowych węzłów chłonnych (MLN) zanim przedostaną się do innych organów i krwi (22, 24).

Makrofagi, które znajdują się w MLN powinny skutecznie zapobiegać dalszej penetracji bakterii. Do redukcji translokacji bakteryjnej powinny się także przyczynić: sekrecyjne immunoglobuliny IgA, limfocyty T (odpowiedź komórkowa) i przeciwciała (odpowiedź humoralna).

Pierwszym mechanizmem obronnym przed translokacją jest sekrecyjna immunoglobulina IgA, która hamuje bakteryjną penetrację do blaszki podstawnej bakterii, nawet tych bakterii, które zwykle nie rezydują w przewodzie pokarmowym: *Vibrio cholerae* i *Salmonella enteritidis* (15).

Następnie, gdy pierwsza linia obrony zawiedzie do akcji wkraczają makrofagi i limfocyty T do blaszki podstawnej, MLN i innych narządów układu limfatycznego. Podanie immunosupresyjnych czynników takich jak: cyklofosfoamid i prednison inicjują translokację flory jelitowej do MLN, śledziony, wątroby i nerek (14).

Wycięcie grasicy (tymektomia) u noworodków myszy również promuje translokację bakteryjną do MLN, śledziony, wątroby i nerek (113).

Rola limfocytów T została przebadana przez usunięcie myszom *in vivo* limfocytów CD4⁺ i/lub CD8⁺ przez wewnątrztrzewnową iniekcję monoklonalnych przeciwciał anti- limfocytom T (55). Stwierdzono, że brak w/w limfocytów w nabłonku jelitowym, blaszce podstawnej, a także MLN inicjuje translokację *E. coli* do MLN.

Makrofagi i leukocyty wielojądrzaste (neutrofile) odgrywają ważną rolę w zapobieganiu translokacji, mimo tego mogą również być wykorzystane przez komórki bakteryjne w transporcie do MLN i innych organów (69, 145).

Immunoglobuliny z kolei, uczestniczą w procesie opsonizacji, który podnosi efektywność fagocytozy przy udziale makrofagów i neutrofilii.

Zastosowanie immunoglobulin przeciwko *E.coli* u myszy redukuje przedostanie się bakterii z MLN do śledziony, wątroby, nerek czy krwi, natomiast nie wpływa na redukcję bakterii uczestniczących w translokacji z przewodu pokarmowego do MLN (56).

1.2.3 Fizyczne uszkodzenie lub upośledzenie funkcji bariery śluzówkowej

Integralność śluzówki jelitowej jest ważną ochroną przed bakteriami zarówno tymi rezydującymi w przewodzie pokarmowym jak i patogenami atakującymi z zewnątrz. I tak np. zastosowanie oleju rycynowego powoduje wiele uszkodzeń śluzówki, które umożliwiają zajście translokacji bakteryjnej (106).

Niedokrwienie-reperfuzja pojawiające się po wstrząsie krwotocznym, endotoksycznym i po oparzeniu powoduje zniszczenie nabłonka jelitowego, co w konsekwencji sprzyja translokacji bakterii z przewodu pokarmowego. Uszkodzenia bariery śluzówkowej, połączone z dysfunkcją wątroby mogą być również przyczyną niewydolności wielonarządowej (32). Przewód pokarmowy reprezentują najliczniej bakterie Gram (-), które produkują endotoksyny podczas lizy i śmierci komórkowej. W niewielkim stopniu są one absorbowane przez przewód pokarmowy, fizjologicznie detoksykacja właściwa następuje w wątrobie. Jednakże, wstrząs, infekcja zwiększają przepuszczalność śluzówki, a to z kolei pozwala na translokację bakterii i ich produktów.

1.2.4 Kombinacja procesów inicjujących proces translokacji

Trzy czynniki inicjujące proces translokacji: zaburzenie składu ilościowego i jakościowego mikroflory jelitowej, fizyczne uszkodzenie lub upośledzenie funkcji bariery śluzówkowej oraz upośledzenie mechanizmów obronnych mogą wywołać ten proces działając pojedynczo lub w kombinacji z innym czynnikiem (15).

Przykłady:

Podawanie myszom antybiotyku doustnie (klindamycynę) razem z czynnikiem immunosupresyjnym (prednison) wywoływało translokację bakteryjną. Wyhodowano bakterie z MLN, wątroby, śledziony, nerek, jamy otrzewnej i krwi. Ilość komórek bakteryjnych w tych narządach rosła w miarę upływu czasu. Po około dwóch tygodniach pojawiła się letalna sepsa (26).

Endotoksemia powoduje zniszczenie bariery śluzówkowej i translokację bakteryjną przy oparzeniu obejmującym 30% powierzchni ciała (93).

Pojedynczy czynnik inicjujący translokację zwykle nie doprowadza do zakażenia uogólnionego, natomiast kombinacja tych czynników powoduje letalną sepsę (15).

Tab. 6 Etapy patogenezy translokacji bakteryjnej z przewodu pokarmowego (15).

Czynniki inicjujące proces translokacji	I etap - MLN	II etap - śledziona/wątroba	III etap - krew	IV etap - zgon
Zaburzenie składu ilościowego i jakościowego mikroflory jelitowej	→			
Fizyczne uszkodzenie lub upośledzenie funkcji bariery śluzówkowej	→			
Upośledzenie mechanizmów obronnych	→			
Kombinacja procesów inicjujących proces translokacji bakteryjnej	→			

Czynniki sprzyjające translokacji bakteryjnej u ludzi (44):

- ∅ niedrożność
- ∅ oparzenia
- ∅ immunosupresja
- ∅ niedożywienie
- ∅ niedotlenienie naczyń krezki
- ∅ leczenie antybiotykami
- ∅ chemioterapia
- ∅ żywienie parenteralne
- ∅ podawanie glikokortykoidów
- ∅ endotoksemia

Schorzenia pacjentów sprzyjające translokacji bakteryjnej: choroba Crohn' a, wrzodziejące zapalenie okrężnicy, stany zapalne jelit, obstrukcja jelitowa, nowotwór jelita, wstrząs pokrwotoczny, niewydolność wielonarządowa, urazy.

Tab. 7 Translokacja bakterii kolonizujących przewód pokarmowy człowieka: *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides* do MLN (25).

Stany chorobowe	Pacjenci (% pozytywny w MLN)	Kontrola (% pozytywny w MLN)
Choroba Crohn' a	33	2
Wrzodziejące zapalenie okrężnicy	75	0
Stany zapalne jelit	16	nie wykryto
Obstrukcja jelitowa	59 39	4 nie wykryto
Nowotwór jelita	65 11	30 nie wykryto
Wstrząs pokrwotoczny	56 33 15	nie wykryto
Niewydolność wielonarządowa	79	nie wykryto
Urazy	81 100	nie wykryto

Pacjenci z chorobą Crohn'a, z wrzodziejącym zapaleniem okrężnicy i stanami zapalnymi jelit charakteryzują się zwiększoną przepuszczalnością śluzówki jelitowej, co przejawia się zwiększoną ilością translokujących bakterii z przewodu pokarmowego do MLN (6, 134). Wykryto również bakterie w MLN przy takich schorzeniach jak: obstrukcja jelitowa i nowotwór jelita (41, 134, 143).

Wstrząs pokrwotoczny tak jak na modelu zwierzęcym powoduje translokacje z przewodu pokarmowego do MLN (104, 105).

Wykryto, także bakterie (kolonizujące przewód pokarmowy) we krwi, u pacjentów ze skurczowym ciśnieniem poniżej 80 mmHg (130).

U 12 pacjentów po urazie (12/16) na 16 badanych zaobserwowano (przy użyciu mikroskopu elektronowego) bakterie w MLN, a wyhodowano tylko 4 szczepy na 16 wyizolowanych z MLN (4/16) (28).

Podobnie wykryto β -galaktozydazę *E. coli* przy zastosowaniu immunofluorescencji w makrofagach (20/20) MLN u 20 pacjentów po urazie na 20 badanych.

Wyhodowano tylko jeden szczep na 20 wyizolowanych z MLN (1/20) (124).

Może tylko to świadczyć o tym, że komórki bakteryjne zostały zniszczone przez komórki układu odpornościowego w czasie przejścia do MLN. Wykryte bakterie w MLN są całkowitą liczbą bakterii, które uległy translokacji.

Translokacja bakteryjna jest brana pod uwagę przy patogenezie sepsy, niewydolności wielonarządowej i w ostrym zespole niewydolności oddechowej (23).

Mechanizmy obronne przed procesem translokacji

Tab. 8 Mechanizmy gospodarza broniące przed translokacją (37).

Mechaniczne	Bakteryjne	Immunologiczne	Inne
Perystaltyka jelit	Antagonizm bakteryjny	Immunoglobuliny IgA	Odczyn kwaśny żołądka
Produkcja śluzu	Oporność kolonizacyjna	Tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (GALT system)	Sole żółciowe
Złuszczenie się nabłonka			Ukł. siateczkowo-śródbłonkowy
Bariera epitelialna			

Flora fizjologiczna przewodu pokarmowego, a zwłaszcza bakterie beztlenowe, zapobiegają kolonizacji przewodu pokarmowego przez bakterie potencjalnie chorobotwórcze. Zjawisko to określa się mianem oporności kolonizacyjnej ("colonization resistance") (141). Bakterie te tworzą fizyczną barierę (biofilm) na powierzchni śluzówki blokując dostęp potencjalnym patogenom. Wszystkie czynniki, które zmniejszają liczbę tych bakterii (np. antybiotyki o szerokim spektrum działania), zwiększają ryzyko translokacji.

Obok mechanicznej bariery stanowiącej przeszkodę w kolonizacji, bakterie przewodu pokarmowego wytwarzają substancje o działaniu antybiotycznym (bakteriocyny) oraz wolne kwasy tłuszczowe, które utrudniają zagnieżdzenie innym drobnoustrojom.

Kolejną barierą utrudniającą translokację jest sama śluzówka przewodu pokarmowego oraz perystaltyka jelit. Perystaltyka jelita cienkiego uniemożliwia bakteriom adhezję do nabłonka przez ich mechaniczne usuwanie.

Gdy perystaltyka zostanie zaburzona, np. przez niedrożność, natychmiast dochodzi do namnożenia drobnoustrojów.

Miejscowe mechanizmy obronne, które utrudniają translokację, warunkowane są obecnością tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego GALT (gut associated lymphoid tissue) oraz sekrecyjne immunoglobuliny IgA. Syntetyzowane przez

limfocyty B sekrecyjne IgA zapobiegają translokacji bakterii poprzez osłonę śluzówki i wiążąc się z receptorami bakteryjnymi, blokują ich dostęp do receptorów nabłonkowych jelita.

Prawdopodobnie znaczną rolę w translokacji odgrywają również sole żółciowe, które wiążą w świetle jelita endotoksynę, uniemożliwiając przedostanie się jej do krążenia. Komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby wychwytyją dostającą się do krwioobiegu endotoksynę, co chroni przed uogólnioną endotoksemią (44).

Etapy translokacji bakteryjnej:

- Ø adherencja bakterii do komórek nabłonkowych
- Ø inwazja, internalizacja bakterii – przenikanie bakterii przez barierę śluzówkową do blaszki podstawnej (lamina propria), penetracja transcelularna (przez komórki) lub paracelularna (pomiędzy komórkami)
- Ø przedostanie się bakterii do układu limfatycznego lub krwionośnego

1.2.7 Badania mechanizmu translokacji bakteryjnej

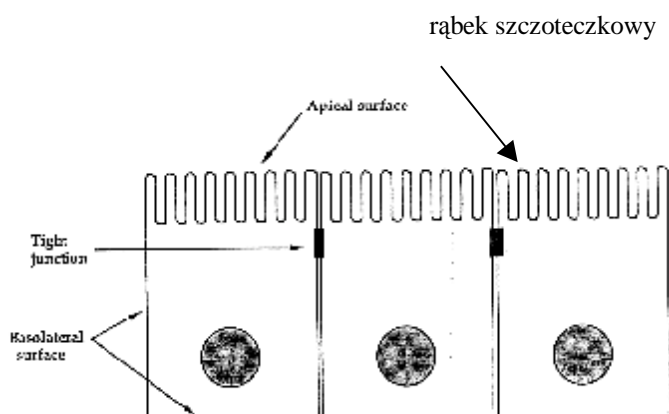
Modele układów

- Ø modele zwierzęce – użyteczny model kompleksowy *in vivo*, posiada wiele czynników, które muszą być pod stałą kontrolą
- Ø hodowle narządów – model kompleksowy, trudny w użyciu, krótkotrwały (7)
- Ø hodowle komórkowe – prostszy i bardziej kontrolowany układ *in vitro*, komórki zawierają rąbek szczoteczki w części apikalnej, “tight junction” – ścisłe połączenia międzykomórkowe- obwódki zamykające, desmosomalne (122).
- Ø spolaryzowane komórki epitelialne hodowane na filtrach – zawierają obwódki zamykające, rąbek szczoteczki z mikrokosmkami, niektóre produkują śluz (117).

Spolaryzowane komórki epitelialne

Spolaryzowane komórki nabłonkowe posiadają: część apikalną, bazolateralną, obwódkę zamykającą oraz rąbek szczoteczki (z mikrokosmkami) w części apikalnej komórki. Część apikalna komórek jest położona od strony światła jelita, część bazolateralna od strony naczyń krwionośnych. Obwódki zamykające (tight junctions) zapewniają integralność i nieprzepuszczalność warstwy nabłonkowej.

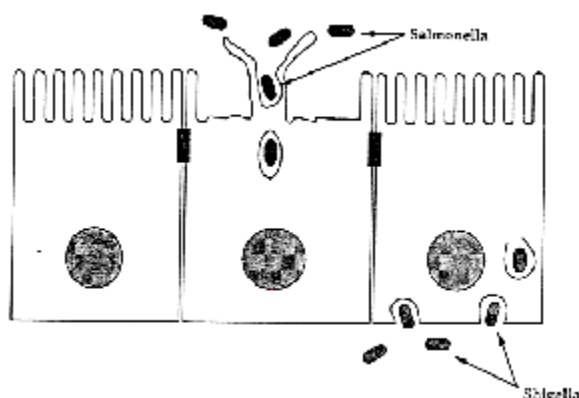
Wszystkie w/w elementy spolaryzowanych komórek zawierają linie komórkowe takie jak: MDCK (komórki nabłonkowe, nerkowe Madin-Darby canine kidney), komórki epitelialne, gruczalokoraka (adenocarcinoma): Caco-2, HT-29, T84 (122).



Ryc. 1. Schemat pojedynczej warstwy (monolayer) spolaryzowanych komórek epitelialnych (apical surface – powierzchnia apikalna, tight junction – obwódka zamykająca, basolateral surface – powierzchnia bazolateralna).

Model tego typu jest przydatny w badaniu adherencji, inwazji i translokacji bakteryjnej przez barierę epitelialną.

Przykładem może być inwazja bakteryjna *S. typhimurium* i *S. choleraesuis*, gdzie inwazja następuje od strony apikalnej (50), natomiast inwazja *Shigella flexneri* następuje od strony bazolateralnej (boczno-podstawnej) (108).



Ryc. 2. Schemat inwazji bakteryjnej: Salmonella i Shigella.

Po inwazji, bakterie mogą przetrwać w środowisku wewnątrzkomórkowym przez utworzenie wakuoli lub pozosać luzem w cytoplaźmie, niektóre bakterie są zdolne do proliferacji wewnątrz komórek nabłonkowych (wewnątrzkomórkowa replikacja).

Przykłady: *Salmonella spp.* (53) i *Yersinia spp.* (103) pozostają wewnątrz wakuoli, mogą się one łączyć z lizosomami, lecz utworzony fagolizosom nie zawiera substancji bakteriobójczych.

Shigella spp., *Listeria monocytogenes* i niektóre *Rickettsia* powodują rozpad wakuoli przez bakteryjne fosfolipazy (hemolizyny), które są aktywowane przez niskie pH wakuoli.

Komórki bakteryjne mogą również poruszać się wewnątrz komórek eukariotycznych dzięki:

- ∅ aktywnym „ogonom” na jednym z biegunów bakterii – bakterie, które powodują rozpad wakuoli (35, 54)
- ∅ strukturom podobnym do pseudopodiów, które mogą być wchłonięte przez sąsiednią komórkę, przy przejściu bakterii do sąsiedniej komórki nabłonkowej lub ponownym wtargnięciu bakterii do cytoplazmy komórki, podwójna błona wakuoli bakterii ulega lizie (4).

Wyjście bakterii z komórek euakariotycznych jest możliwe dzięki (59):

- ∅ transportowi przez komórki M
- ∅ obumarciu komórek
- ∅ lizie zainfekowanych makrofagów

Nic nie wiadomo natomiast, o „ucieczce” bakterii, otoczonych błoną wakuoli.

Konsekwencje zaburzeń w funkcjonowaniu bariery śluzówkowej

Podstawową funkcją warstwy nabłonkowej układu pokarmowego jest transport składników odżywczych i nieprzepuszczalność dla ciał obcych. Bariera żołądkowo-jelitowa składa się z przylegających do siebie komórek nabłonkowych, które połączone są tzw. obwódkami zamykającymi.

Nieprzepuszczalność warstwy nabłonkowej zależy zatem od w/w połączeń i od części apikalnej komórek epitelialnych. Z tych względów bakterie mogą dokonać inwazji rozrywając ścisłe połączenia międzykomórkowe (penetracja paracelularna), efekt międzykomórkowy lub zmieniając przepuszczalność powierzchni w części apikalnej komórki nabłonkowej (penetracja transcelularna), efekt wewnątrzkomórkowy (25).

Rola komórek M w translokacji bakteryjnej

Tkanka limfoidalna przewodu pokarmowego GALT zbudowana jest z kępek Peyera, grudek chłonnych, wyrostka i krezkowych węzłów chłonnych MLN (81).

Szczególnie interesujące z punktu widzenia oddziaływań z mikroflorą jelitową są kępki Peyera, skupiające subepitelialne grudki chłonne, znajdujące się w jelicie cienkim (najwięcej jest ich w jelicie krętym). Grudki chłonne pokryte są wyspecjalizowanym nabłonkiem FAE (follicle-associated epithelium), którego skład różni się od nabłonka kosmków. FAE zbudowane są z komórek absorpcyjnych, kubkowych produkujących śluz oraz z komórek M (10%) o unikalnej budowie (148). Komórki M w części apikalnej posiadają mikrofałdy. Powierzchnia położona przeciwnie do światła jelita posiada położoną centralnie wewnętrzną kieszeń, w której poruszają się w większości makrofagi i limfocyty oraz komórki plazmatyczne i neutrofile (148).

Komórki M pełnią funkcje transportowe ze względu na ogromną ilość zagłębień i kanalików. Właściwość ta jest wykorzystana przez bakterie chorobotwórcze, które mają ułatwioną drogę ze światła jelita do FAE.

W literaturze istnieje co raz więcej dowodów, że kępki Peyera stanowią drogę zakażenia przez wiele enteropatogenów.

Rola fagocytów w procesie translokacji bakteryjnej

Fagocyty takie jak: makrofagi i granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) położone w sąsiedztwie nabłonka jelitowego (w wewnętrznej kieszeni komórek M) odgrywają zasadniczą rolę w mechanizmach obronnych organizmu, chroniąc go zwłaszcza przed infekcją bakteryjną.

Makrofagi biorą udział w procesie fagocytozy, uczestniczą w odpowiedzi zapalnej, aktywacji limfocytów oraz w procesie naprawy tkanek.

Neutrofile mają właściwości bakteriobójcze, poza tym odpowiadają chemotaktycznie cytokinom: IL-1 i IL-8.

Makrofagi i neutrofile odgrywają kluczową rolę w transporcie bakterii przez barierę śluzówkową, wykorzystując je do przemieszczania się przez nabłonkowe i śródnabłonkowe bariery.

Bakterie uruchamiają mechanizmy, które chronią je przed fagocytozą makrofaga poprzez:

- Ø produkcję enzymów takich jak: katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa – tlenozależne procesy (123).
- Ø odporność na fagolizosomowe enzymy (hydrolazy, lizozym), *Shigella flexneri* (132), *Listeria monocytogenes* (118).
- Ø apoptozę makrofaga 3 godziny po infekcji - *Shigella flexneri* (152).

Podczas infekcji *Shigella flexneri*, neutrofile w czasie transmigracji rozrywają połączenia międzykomórkowe nabłonka. Bakterie dzięki tak położonemu neutrofilowi przedostają się do powierzchni bazolateralnej (boczno-podstawnej) komórki i dokonują inwazji na sąsiednie komórki epitelialne (116).



Ryc.3. Udział neutrofilów w translokacji bakteryjnej *Shigella flexneri*.

1.2.8 Translokacja bakteryjna i *Staphylococcus aureus*

Mimo wzrastającej ilości badań na temat translokacji bakteryjnej to jednak mechanizm tego procesu jest wciąż mało poznany. Najwięcej wiadomo na temat translokacji u bakterii tlenowych i fakultatywnych (stanowiącą naturalną florę jelitową), które w odpowiednich warunkach (opisanych wcześniej), mogą ulegać translokacji. Bakterie bezwzględnie beztlenowe z reguły stanowią barierę ochronną (biofilm) przed patogenami.

S. aureus jest jedną z głównych przyczyn zakażeń szpitalnych, znajduje się w czołówce szczepów izolowanych z krwi od dorosłych i od dzieci z oddziałów intensywnej terapii i oparzeń (126).

Zakażenia gronkowcowe są trudne do leczenia mimo właściwej antybiotykoterapii (1). *Staphylococcus aureus* może kolonizować ludzki przewód pokarmowy, który może stać się rezerwuarem dla opornych szczepów (47, 48, 60, 127).

Ostatnio ukazały się dwa doniesienia sugerujące możliwość występowania patogennych szczepów gronkowcowych w przewodzie pokarmowym i ich translokacji. W pierwszej pracy stwierdzono wysoką liczebność szczególnych szczepów *Staphylococcus aureus* u dzieci, a jej autorzy sugerują wprost, że jest to potencjalne źródło translokacji (102). W drugiej pracy wykazano możliwość istnienia czynników patogenności gronkowców, mogących odpowiadać za ten proces (63). Autorzy tej pracy, wykazali przewagę obecności szczepów MRSA pochodzenia szpitalnego w treści jelitowej chorych leczonych antybiotykami w szpitalu. Szczepy te, różniły się na podstawie identyfikacji prążków w metodzie PFGE, od szczepów rezydujących na skórze tych pacjentów, a ponadto 90% z nich produkowało leukocydyny, a 76% enterotoksynę A. Znając cechy tych toksyn, można przypuszczać, że właśnie one mogą być czynnikiem uszkadzającym nabłonek jelitowy, a zatem stwarzającym warunki dla translokacji jelitowej w przypadku gronkowców.

Jednym z najciekawszych i najbardziej intrygujących spostrzeżeń wynikających z analizy danych epidemiologicznych, bakteriologicznych oraz genetycznych ostatnio przeprowadzonych badań jest współistnienie populacji gronkowców o różnej "skłonności" do zakażeń miejscowych lub uogólnionych. Te obserwacje były możliwe przy przeprowadzeniu analizy częstości występowania zakażeń miejscowych i uogólnionych u tych samych chorych i dzięki długiemu okresowi prowadzonych badań. Obowiązujące dotychczas teorie zakładały, że do sepsy u chorych oporzonych dochodzi w wyniku kontaminacji rany oparzeniowej, w jej następstwie do zakażenia, a po pokonaniu barier obronnych, dochodzi do wnikania mikroorganizmów do krwioobiegu. Z badań wynika że, szczepy wyizolowane z rany oparzeniowej były różne fenotypowo i genotypowo od szczepów obecnych we krwi. To spostrzeżenie stwarza możliwość dalszych hipotez. Najbardziej prawdopodobna

z nich zakłada możliwość przechodzenia odpowiednio “wyposażonych” inwazyjnych szczepów gronkowca złocistego nie ze skóry chorego, lecz z jego przewodu pokarmowego, w wyniku translokacji bakteryjnej (30).

1.3 Udział cytokin w procesach obronnych organizmu

Reakcje immunologiczne, zapalenia i modelowanie tkanek w procesach regeneracyjnych są regulowane przez produkty syntetyzowane *de novo* w limfocytach, monocytach/ makrofagach, fibroblastach, komórkach śródbłonna i morfotycznych krwi oraz w wielu innych pod wpływem zadziałania czynnika pobudzającego komórkę. Substancje te nazywane są cytokinami lub interleukinami (czyli komórkami przekazującymi informacje między białymi krwinkami) i wywierają swój wpływ poprzez wiązanie się ze specyficznym receptorem błonowym na powierzchni komórki (8).

Większość cytokin to glikoproteiny o masie cząsteczkowej 15 000-25000 daltonów i strukturze ograniczonej do około 150 aminokwasów.

Klasyfikacja cytokin

Klasyfikacja strukturalna cytokin (8):

- Ø Interleukiny (IL)
- Ø Interferony (IFN)
- Ø Czynniki martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF)
- Ø Czynniki wzrostu (growth factors – GF's)

Klasyfikacja funkcjonalna cytokin (8):

- Ø Cytokiny mediatorzy reakcji odpornościowych. Do tej grupy zaliczane są interleukina 1, tumor necrosis factor α (**TNF-a**), interferony typu I i **interleukina 8**. Interferony stanowią naturalną obronność na zakażenia wirusowe, podczas gdy pozostałe cytokiny są odpowiedzialne za zainicjowanie reakcji immunologicznych.
- Ø Cytokiny regulujące wzrost. Do grupy tej zalicza się interleukiny: 2, 4, 5, 12 i TGF- β (transforming growth factor β) powodujący wzrost limfocytów, płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF).

- Ø Cytokiny aktywujące komórki nacieku zapalnego. Określane one są mianem “prozapalnych”, są to: IFN- γ , **TNF- α** , TNF- β , **IL-8**.
- Ø Cytokiny aktywujące hemopoezę szpikową (colony stimulating factors-CSF). Ich działanie wszystkich linii komórkowych szpiku.

Klasyfikacja cytokin ze względu na aktywność biologiczną (65):

- Ø Czynniki wzrostowe mezenchymalne (PDGF, FGF, TGF- β , VEGF, EGF, TGF- α)
- Ø Czynniki wzrostowe komórek T (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12)
- Ø Czynniki wzrostowe komórek B (IL-4, IL-5, IL-6, IL-14)
- Ø Czynniki hematopoetyczne (IL-3, M-CSF, G-CSF, GM-CSF)
- Ø Czynniki chemotaktyczne (**IL-8**, MCP-1, MIF)
- Ø Cytokiny prozapalne (IL-1, **TNF**, IL-6, **IL-8**)
- Ø Cytokiny przeciwzapalne (G-CSF, IL-1ra, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13)
- Ø Cytokiny cytotoksyczne/ inhibitory wzrostu (TNF, LT, OSM)
- Ø Cytokiny antywirusowe (interferony)

Cytokiny pojawiające się w wyniku odpowiedzi na zakażenie (65):

- Ø Inicjacja zapalenia: IL-1 α , IL-1 β , **TNF- α** ; cytokiny te mogą działać synergistycznie, również z LPS-em
- Ø Podtrzymywanie zapalenia: chemokiny, **IL-8**, Gro- α , i - β , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, 2, 3; IL-6, interferony
- Ø Zejście zapalenia i jego kontrola: IL-1ra, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β
- Ø Cytokiny włączone w procesy naprawcze oraz cytokiny wzrostowe: CSF-y , EGF, TGF- α , FGF, PDGF, rodzina TGF- β .

Udział cytokin – IL-8 i TNF- α w procesach obronnych organizmu

IL-8 (neutrophil activating protein (NAP), neutrophil-chemotactic factor (NCF)

Z w/w podziałów cytokin, wynika, że IL-8 zalicza się do: cytokin - mediatorów reakcji odpornościowych, czynników chemotaktycznych i cytokin prozapalnych oraz w podtrzymywaniu zapalenia.

IL-8 syntetyzowana jest przez aktywowane makrofagi, a także przez wiele innych komórek (komórki śródbłonna, fibroblasty) i powoduje w ognisku zapalnym dominację

granulocytów obojętnochłonnych. Zaliczana jest do grupy chemokin, w skład których wchodzi także czynnik płytkowy (platelet factor, PF-4), monocytarny (monocyte chemoattractant protein, MCP-1) oraz RANTES – czynnik chemotaktyczny dla tymocytów. IL-8 jest syntetyzowana w znacznych ilościach pod wpływem działania IL-1 i TNF- α (8).

TNF- α (TNFa) czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor)

Wyróżnia się dwa podtypy tych białek – α i β . Oba typy TNF reagują z identycznym receptorem na powierzchni komórek, stąd ich działanie jest podobne, różni je natomiast pochodzenie. TNF- α jest syntetyzowany przez aktywowane makrofagi, natomiast TNF- β przez aktywowane limfocyty T.

TNF odgrywa wraz z IL-1 kluczową rolę w reakcji wczesnej odpowiedzi immunologicznej poprzez działanie na śródbłoki naczyń, fibroblasty, degranulację i aktywację granulocytów, indukuje syntezę innych mediatorów (IL-1, GM-CSF, PAF, leukotrieny, prostaglandyny), a także należy do grupy tzw. endogennych pirogenów, substancji mających zdolność podwyższania temperatury (8).

2. ZAŁOŻENIE I CELE PRACY

Zakażenia szpitalne spowodowane przez *Staphylococcus aureus* zwłaszcza szczepem metycylinoopornym są bardzo trudne w leczeniu ze względu na rosnącą oporność tych szczepów.

Pacjenci po urazie termicznym z rozległą powierzchnią oparzenia są szczególnie narażeni na różnego rodzaju infekcje, w tym na infekcje wywołane przez MRSA. Do tej pory przyjmowano koncepcję, że do zakażenia uogólnionego dochodzi w wyniku kontaminacji rany oparzeniowej, a w jej następstwie do zakażenia, a po pokonaniu barier obronnych, dochodzi do wnikania mikroorganizmów do krwioobiegu.

Wiadomo, że przewód pokarmowy może być rezerwuarem dla opornych szczepów gronkowca i być może w niektórych przypadkach do zakażenia krwi dochodzi nie z rany pacjenta, ale właśnie z przewodu pokarmowego w wyniku translokacji bakteryjnej.

Moja rozprawa doktorska służy wyjaśnieniu tego prawdopodobnego zjawiska na poziomie komórkowym.

Cele pracy

Analiza fenotypowa szczepów

- Ø określenie czynników etiologicznych zakażeń: ran, krwi i odbytu od pacjentów hospitalizowanych na Oddziałach Leczenia Oparzeń : z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS), Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P) i Szpitala im. Rydygiera w Krakowie (Rd).
- Ø charakterystyka szczepów: przynależność gatunkowa, lekowrażliwość, oznaczanie wzorów oporności.

Analiza genotypowa szczepów

- Ø wykazanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA metodą PFGE
- Ø określenie wzorów restrykcyjnych szczepów
- Ø porównanie wzorów PFGE szczepów gronkowcowych pochodzących z rany, krwi i odbytu

Badanie mechanizmu translokacji bakteryjnej gronkowców przez barierę śluzówkową *in vitro* przy użyciu komórek epitelialnych i endotelialnych

- Ø badanie interakcji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym (typ dziki, mutant) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych i czasu trwania inkubacji – ocena akumulacji transkryptów cytokin IL-8, TNF- α przy użyciu RT-PCR.
- Ø badanie adherencji, inwazji gronkowców – typu dzikiego (WT) i mutantu (MT), *Salmonella enteritidis* (pozytywna kontrola) oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych przy użyciu komórek epitelialnych i endotelialnych
- Ø badanie wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych na inwazję *S. aureus* - typu dzikiego (WT) i mutantu (MT) oraz *Salmonella enteritidis*
- Ø badanie translokacji bakteryjnej gronkowców – typu dzikiego (WT) i mutantu (MT), *Salmonella enteritidis* (pozytywna kontrola) oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiał do badań - szczepy bakteryjne

Analizie ogółem poddano 77 szczepów gronkowców izolowanych z ran, krwi i odbytu (R, K, O) od 42 pacjentów po urazie termicznym hospitalizowanych w latach 2001-2002 w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS), Oddziału Leczenia Oparzeń Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P) oraz Oddziału Leczenia Oparzeń i Chirurgii Plastycznej szpitala im. Rydygiera w Krakowie (Rd).

Pobrany materiał	CLOS	P	Rd
Izolacja i identyfikacja gronkowca	Mikrobiologiczne Laboratorium Przyszpitalne	Zakład Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ	Mikrobiologiczne Laboratorium Przyszpitalne
Otrzymany materiał do analizy	Skos ze szczepem gronkowcowym	Wymaz z rany, odbytu, krew	Skos ze szczepem gronkowcowym
Weryfikacja badanych szczepów	Zakład Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ	Zakład Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ	Zakład Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CM UJ

Tab. 9 Izolacja i identyfikacja gronkowca.

Izolacja i identyfikacja szczepów bakteryjnych pochodzących z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich oraz Szpitala im. Rydygiera w Krakowie wykonano metodami standardowymi (109) w Laboratorium Mikrobiologicznym w/w szpitali, następnie zweryfikowano w Zakładzie Bakteriologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Izolacja i identyfikacja szczepów bakteryjnych pochodzących z Oddziału Leczenia Oparzeń Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie - Prokocimiu wykonano metodami standardowymi (109) w Zakładzie Bakteriologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

W badaniu mechanizmu translokacji bakteryjnej (The Rowett Reserach Institute, Wielka Brytania) wykorzystano szczepy referencyjne gronkowca złocistego - typ dziki (25923) i mutant (10832) z ATCC (AmericanType Culture Collection) - Amerykańskiej Kolekcji Mikroorganizmów oraz *Salmonella enteritidis* (S1400) z kolekcji Kellog Laboratory The Rowett Research Institute.

Pobieranie materiału

Materiał do badań stanowiły wymazy z rany, posiew krwi i głęboki wymaz z odbytu.

Wymaz z rany

Materiał pobierano po stwierdzeniu jakichkolwiek objawów zakażenia miejscowego. Przy rozległych ranach materiał pobierano jałowym wacikiem z pogranicza zmiany zapalnej i skóry zdrowej.

Posiew krwi

Wskazaniem do badania mikrobiologicznego krwi były kliniczne objawy zakażenia uogólnionego krwi.

Krew pobierano wg ustalonej procedury (85). W zależności od wieku pacjenta zalecano pobieranie różnych objętości krwi. U pacjentów dorosłych pobrano krew w ilości 5 ml/50 ml podłoża. Do podłoż pediatrycznych pobrano krew w ilości 1-3 ml.

Głęboki wymaz z odbytu

W tym celu jałowym wacikiem zwilżonym jałowym roztworem soli fizjologicznej kilkakrotnie wykonywano ruch obrotowy po powierzchni śluzówki odbytnicy.

3.2 Charakterystyka szczepów izolowanych od chorych oparzonych – cechy fenotypowe

Metody fenotypowe – polegały na oznaczaniu: wybranych cech morfologicznych i biochemicznych, oznaczaniu aktywności enzymatycznej, typu wzrostu na podłożu, oraz ustaleniu wrażliwości na wybrane chemioterapeutyki (30).

3.2.1 Hodowla i identyfikacja gatunku

Do izolacji i identyfikacji szczepów stosowano następujące podłoża: podłoże Chapmana (do różnicowania gronkowca złocistego), podłoże Mueller – Hinton (do badania lekowrażliwości), podłoże McConkey'a (do różnicowania pałeczek Gram-ujemnych laktozo (+)), bulion z solą i podłoże z eskuliną (do różnicowania *Enterococcus species* i *E. faecalis*).

Szczepy gronkowców hodowano na podłożu stałym – agarowym z 5% odwłóknioną krwią baranią z i płynnym (bulionie) - tryptozowo-sojowym (Tryptic Soy Broth - TSB) oraz w bulionie z wyciągiem z mózgu cielęcego i serca wołowego (Brain Heart Infusion Broth, BHI).

Szczepy z kolekcji ATCC - *Staphylococcus aureus* typu dziki (25923), oraz mutant (10832) hodowano na podłożu BHI.

Salmonella enteritidis hodowano na podłożu płynnym Lowry Broth - LB.

Wszystkie szczepy kliniczne przeznaczone do dalszych badań namnażano w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB, Difco) z dodatkiem 10% glicerolu, a następnie przechowywano na perełkach szklanych, w temp. -70°C (83).

Przed wykonaniem dalszych badań szczepy pasażowano na agarze Columbia (Difco) z 5% odwłóknioną krwią baranią inkubowano hodowlę przez 18-24 godz. w temp. 37°C w warunkach tlenowych.

Skład podłoży.

Płytką krwawa - agarowa z zawartością 5% odwłóknionej krwi baraniej

Columbia Blood Agar Base (Oxoid):

	g/l
Specjalny pepton	23
Skrobia	1
Chlorek sodu	5
Agar	10

pH = $7,3 \pm 0,2$ w temp. 25°C

Po wyjąłowieniu w temp. 121°C i ciśnieniu 1 atm. przez 15 min., ochłodzono składniki do temp. 50°C dodano odwłóknioną krew barania, tak aby stanowiła 5% podłoża.

Podłoże płynne TSB (Tryptic Soy Broth -tryptozowo-sojowym) (Difco):

	g/l
Bacto-Tryptone (wyciąg trzuskowy)	17
Bacto-Soytone (wyciąg sojowy)	3
Dekstroza	2,5
Chlorek sodu	5
Fosforan dwupotasowy	2,5

pH = $7,3 \pm 0,2$ w temp. 25°C

Składniki rozpuszczono w 1l wody i doprowadzono do pH ok.7,3.

Wyjąłowiano w autoklawie w temp. 121°C i ciśnieniu 1 atm przez 15 min.

Bulion

	g/l
Protease Peptone No.3 (Difco)	10
Tryptose (Difco)	10
Wyciąg wołowy	3,0
Amid kwasu nikotynowego	0,05
Kwas p-aminobenzoowy	0,05
Dekstroza	0,5
Skrobia	1,0
Chlorek sodu	5,0
Glukoza	1% 1,0

pH = $7,3 \pm 0,2$ w temp. 25°C

Podłoże płynne z solą (NaCl) – do w/w podłoża dodano 60 g/l chlorku sodu.

Podłoże płynne BHI (Brain Heart Infusion Broth - Oxoid) – z wyciągiem z mózgu
cielęcego i serca wołowego:

	g/l
wyciąg z mózgu cielęcego	12,5
wyciąg z serca wołowego	5,0
Proteose peptone	10,0
Glukoza	2,0
Chlorek sodu	5,0
Fosforan dwusodowy	2,5
pH = 7,4 ± 0,2	

Podłoże płynne LB (Lowry-Broth)

1% bacto- trypton
0,5% wyciąg drożdżowy
1% NaCl
pH = 7,0 ± 0,2

Podłoże Chapmana

	g/l
Agar	15,0
Suchy wyciąg wołowy	3,0
Pepton tryptone (Difco)	5,0
Chlorek sodowy	75,0
Mannitol	10,0
Czerwień fenolowa (0,2% roztw., w 50% alk.etyl.)	12,5 ml
woda destylowana	950 ml
pH = 7,4 ± 0,2	

Podłoże Mueller Hinton II (Biocorp)

	g/l
Wyciąg wołowy	2,0
Kwaśny pepton kazeinowy	17,50

Skrobia	1,5
Agar	17,0
pH = 7,4 ± 0,2	

Podłoże z eskulina – Bile Esculine Agar (Fluka)

	g/l
Wyciąg mięsny	3,0
Pepton mięsny	5,0
Ox-bile	40,0
Cytrynian żelazowy	0,5
Eskulina	1,0
Agar	14,5
pH = 6,4 ± 0,2	

Podłoże McConkey (Biocorp)

	g/l
Pankreatynowy hydrolizat żelatyny	17,0
Miesznina peptonów	3,0
Sole żółci	1,5
Chlorek sodu	5,0
Laktoza	10,0
Fiolet krystaliczny	0,001
Czerwień obojętna	0,03
Agar	13,5
pH = 7,1 ± 0,2	

Podłoże Sabourauda

	g/l
Neopepton	10
Glukoza	40
Gentamycyna	100 mg
Agar	2 g

pH = 5,8-6,0

Wszystkie w/w podłoża sterylizowano w autoklawie w temp. 121⁰C i ciśnieniu 1 atm przez 15 min.

Izolacja i identyfikacja czynników etiologicznych, w tym gronkowcowych z rany, odbytu i krwi od pacjentów z Oddziału Leczenia Oparzeń Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu.

Izolacja i identyfikacja gronkowca z rany i odbytu .

1. Pobrany materiał wysiewano na podłoża: krwawe, McConkey'a (wybiórcze dla *Enterobacteriaceae* i innych pałeczek Gram-ujemnych laktozo „,+”) i Sabourada (wybiórcze dla grzybów). Wacik z materiałem umieszczono w bulionie TSB. Inkubacja trwała 18-24 godz. w temp. 37⁰C.
2. Po 24 godzinnej hodowli izolowano różne kolonie bakteryjne na sektor celem namnożenia większej ilości szczepu. Izolowano gronkowce, paciorkowce.
3. Inkubowano 24 godz. ponownie namnożone sektory, po czym wykonano preparaty barwione metodą Grama.
4. Gronkowce diagnozowano przez założenie koagulazy próbówkowej, wysianie szczepów na podłoże Chapmana, wykonanie testu biochemicznego API STAPH oraz nałożenie krazka nowobiocyny i metycyliny.
5. Namnożone paciorkowce przesiano na bulion z solą i na skos z eskuliną i identyfikowano metodami standardowymi (109).

Standardowy, trzykrotny posiew krwi.

1. Hemomedium (podłoże transportowe przeznaczone do wzrostu dla bakterii tlenowych) z pobraną próbką krwi pozostawiono w cieplarni do namnożenia bakterii przez 24 godz.
2. Przy użyciu sterylnej strzykawki i igły posiano jedną kroplę podłoża z badaną krwią na płytkę krwawą podłoże McConkey'a.
3. Płytki oraz podłoże wzrostowe z badaną krwią inkubowano przez następne 24 godz. w temp. 37⁰C.
4. Po inkubacji sprawdzono wyniki. Jeśli wynik był ujemny, próbki krwi ponownie posiewano na podłoża i inkubowano płytki oraz podłoże transportowe z krwią przez następne 24 godz. Wynik dodatni uznano za dodatni jeśli były widoczne

kolonie bakteryjne na powierzchni podłoża agarowego, które następnie wyizolowano i zidentyfikowano metodami standardowymi (109).

5. Po inkubacji sprawdzono wynik, jeśli wynik był ujemny całą procedurę powtórzono jeszcze raz.

3.2.2 Identyfikacja gronkowca złocistego

Do identyfikacji gronkowca złocistego stosuje się metody standardowe (109):

1. Ocena morfologii kolonii na podłożu krwawym.
2. Typ hemolizy na podłożu agarowym z dodatkiem krwi.
3. Hodowla na agarze z mannitolem (podłoże Chapmana).
4. Badanie mikroskopowe – barwienie metodą Grama.
5. Test probówkowy na obecność koagulazy.
6. Test szkiełkowy na obecność clumping factor.
7. Test krążkowy na nowobiocynę
8. Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API STAPH.

Ocena morfologii kolonii na podłożu krwawym.

Materiały wyjściowe posiewano metodą redukcyjną na podłożu agarowym z dodatkiem krwi. Po 24 godz. w temp. 37⁰C w warunkach tlenowych obserwowano typ wzrostu i hemolizy na płytce krwawej.

Hodowla na agarze z mannitolem (podłoże Chapmana).

Równoległe do posiewu na podłoże krwawe wykonano posiew na podłoże Chapmana. Inkubowano 48 godz. w warunkach tlenowych w temp. 37⁰C . Po inkubacji obserwowano wzrost gronkowca w postaci żółtych kolonii i zmianę zabarwienia podłoża z różowego na żółty (efekt fermentacji mannitolu).

Badanie mikroskopowe – barwienie metodą Grama (144).

Przygotowanie preparatów do barwienia:

- Ø Preparat przygotowano na odtłuszczonych szkiełkach podstawowych.
- Ø Na szkiełko podstawowe naniesiono 1-2 krople roztworu 0,85% NaCl
- Ø Po wyżarzeniu i ostudzeniu ezy, pobrano masę bakteryjną z płytki i rozprowadzono ją w roztworze zawieszającym

- Ø Rozmaz wysuszono w temp. pokojowej
- Ø Po wysuszeniu preparat utrwalono, przeciągając szkiełko trzykrotnie w płomieniu palnika

Etapy barwienia metodą Grama:

- Ø Zalano szkiełko roztworem fioletu krystalicznego na 2-3 min.
- Ø Utrwalono płynem Lugola (roztwór jodu w jodku potasu) na 1,5-2 min.
- Ø Odbarwiono etanolem (90% z dodatkiem acetonu) przez 30 sek.
- Ø Dobarwiono barwnikiem kontrastowym (fuksyną lub safraniną) przez 15 sek.

Po każdym etapie barwienia preparat płukano bieżącą wodą. Następnie preparat wysuszono i oglądano w mikroskopie świetlnym.

Test probówkowy na obecność koagulazy.

Test na wytwarzanie koagulazy odróżnia *Staphylococcus aureus* od *Staphylococcus epidermidis*.

Do osocza króliczego, rozcieńczonego izotonicznym roztworem NaCl 1:5 dodano 1ml 24 godz. hodowli płynnej TSB badanego szczepu lub jedno oczko ezy z hodowli na podłożu stałym. Zawiesinę w osoczu inkubowano w temp. 37⁰C przez 24 godz.

Wynik próby odczytywano po 1, 3, 6 i 24 godz.

Test szkiełkowy na obecność clumping factor.

Czynnik clumping factor (CF) wykrywa się prostą metodą na szkiełku podstawowym. Do kropli zawiesiny badanego szczepu dodano kroplę osocza. Szybkie zlepianie się bakterii zachodzące w ciągu 5-15 sek. dowodzi obecności CF.

Test krążkowy na nowobiocynę

Techniką dyfuzji w żelu agarowym oznaczono metodami standardowymi oporność badanych szczepów gronkowcowych na nowobiocynę (NOV) (109).

1. Kilka kolonii wyizolowanych z posiewu redukcyjnego badanego szczepu na agarze krwawym zawieszono w 2 ml jałowego roztworu fizjologicznego NaCl, tak aby uzyskać zawiesinę o zmętnieniu odpowiadającym 0,5 jednostek McFarlanda (10⁸ CFU/ml).

2. Gotową zawiesinę wysiewano na agar Mueller-Hintona przy użyciu bawełnianego wacika, który po jednokrotnym zamoczeniu wyciskano o ścianę probówki. Raz nabrany wacikiem materiał trzykrotnie rozprowadzano po powierzchni agaru zmieniając za każdym razem kąt posiewu o 60°C.
3. Po 3-5 min., na posiane podłoże nakładano krążek nasycyony nowobiocyną i delikatnie dociśnięto do powierzchni agaru. Płytki odwrócono do góry dnem i inkubowano w temp. 37°C w warunkach tlenowych przez 24 godz.
4. Wyniki oznaczeń odczytywano po w/w czasie inkubacji (30).

Tab. 10 Diagnostyka różnicowa gatunków gronkowców (144).

Cecha	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Kolor kolonii	żółty lub biały	biały	biały lub bladopopielaty
Hemoliza	+	±	–
Wydzielanie koagulazy	tak	nie	nie
Fermentacja mannitolu	tak	nie	tak
Wrażliwość na nowobiocynę	wrażliwy	wrażliwy	oporny

Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API STAPH (bio-Mérieux).

API STAPH jest systemem służącym do identyfikacji rodzajów *Staphylococcus* oraz *Micrococcus*, przy wykorzystaniu wystandaryzowanych i zminiaturyzowanych prób biochemicznych. Szereg identyfikacyjny składa się z 20 mikroprobówek zawierających odwodnione substraty (podane w tab. 14).

Skład podłoży i odczynników:

API STAPH Medium (6 ml)	Wyciąg z drożdży	0,5g
	Bactopeptone	10g
	NaCl	5g
	Elementy śladowe	10 ml
	Woda demineralizowana	qsp 1000ml
	pH: 7,0-7,4	
VP1 (5 ml)	Wodorotlenek potasowy	40g
	Woda	100ml
VP2 (5 ml)	α -naftol	6g
	Etanol	100 ml
NIT 1 (5 ml)	Kwas sulfanilowy	0,4g
	Kwas octowy	30g
	Woda	70 ml
NIT 2 (5 ml)	N,N-dimetyl-1-naftylamina	0,6g
	Kwas octowy	30g
	Woda	70 ml
ZYM A (5ml)	Tris-hydroxymetyl- aminometan	25g
	Kwas solny (37%)	11 ml
	Laurylosiarczan sodowy	10g
	Woda	100 ml
ZYM B (8 ml)	Fast Blue BB	0,35g
	2-metoksyetanol	100 ml

1. Przygotowano spód i wieczko komory inkubacyjnej, wiano 5 ml wody destylowanej na spód komory celem zapewnienia odpowiedniej wilgotności środowiska.

2. Pasek z szeregiem biochemicznym włożono do komory inkubacyjnej.
3. Do probówki z API STAPH Medium wprowadzono jedną kolonię z hodowli całonocnej (18-24 godz. w temp. 37°C) na płycie agarowej z dodatkiem krwi, w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny o zmętnieniu 0,5 w skali McFarlanda.
4. Za pomocą jałowej pipety napełniono mikroprobówki zawiesiną bakteryjną do połowy wysokości.
5. Wytworzono warunki beztlenowe w mikroprobówkach ADH i URE napełniając ich górną część olejem parafinowym
6. Zamknięto komorę inkubacyjną i inkubowano w temp. 37°C przez 18-24 godz.
7. Po inkubacji dodano po jednej kropli każdego z następujących odczynników: VP1 oraz VP2 do mikroprobówki VP, NIT1 i NIT2 do mikroprobówki NIT oraz ZYM A i ZYM B do mikroprobówki PAL. Oczekano 10 min.

Charakterystyka szczepów gronkowcowych (metycylinoopornych – MRSA, metycylino-wrażliwych – MSSA) metodami fenotypowymi.

Oznaczanie oporności badanych szczepów gronkowcowych na metycylinę.

Techniką dyfuzji w żelu agarowym oznaczano oporność badanych szczepów gronkowcowych na metycylinę (MET). Badanie wykonano według zaleceń NCCLS (110).

Przebieg badania był identyczny jak w "Teście krążkowym na nowobiocynę" z pewnymi modyfikacjami w pkt. 2, 3.

W pkt.2 gotową zawiesinę wysiewano na agar Mueller-Hintona z zawartością 5% NaCl.

W pkt.3 Na posiane podłoże nakładano krążek z 5 µg metycyliny (Oxoid) lub z 5 µg oksacyliny (Oxoid).

Badanie lekowrażliwości na inne chemioterapeutyki szczepów metycylinoopornych (MRSA), i metycylinowrażliwych (MSSA) stosując metodę dyfuzyjno-krażkową Kirby i Bauera (9) wg zaleceń NCCLS (110)

Przebieg badania był identyczny jak w "Teście krążkowym na nowobiocynę" z modyfikacją w pkt.3.

Na posiane podłoże nakładano krążki następujących antybiotyków: erytromycynę – E (15 µg), klindamycynę – DA (2 µg), kotrimoksazol – SXT (25 µg - trimetoprim 1,25 µg sulfametoksazol 23,75 µg), ciprofloksacynę – CIP (5 µg), gentamycynę – GE (10 µg) , wankomycynę- VA (30 µg), teikoplaninę –TEC (30 µg) , mupirocynę – MUP (200 µg), ryfampicyna – RA (5 µg) kwas fusydynowy - FD (10µg).

Powyższa skróty antybiotyków zastosowano w tabelach i rycinach.

Krażki pochodziły z firmy Becton Dickinson.

3.3 Charakterystyka szczepów gronkowcowych – cechy genotypowe.

Analizę genetyczną gronkowców przeprowadzono za pomocą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (Pulsed Field Gel Electrophoresis PFGE) przy użyciu zestawu odczynników GenePath Group 2 Reagent Kit oraz aparatu GenePath System firmy Bio-Rad.

Procedura poszczególnych etapów została wykonana na podstawie "GenePath Group 2 Reagent Kit Instrukcja Obsługi".

Składniki zestawu stosowanego w metodzie elektroforezy pulsacyjnej:

Moduł uniwersalny

Bufor do zawieszania komórek	12 ml
Agarozą do zatapiania	12 ml
Bufor dla proteinazy K	30 ml
Proteinaza K (>600U/ml)	1,3 ml
Bufor płuczący 10x	60 ml

Moduł enzymatyczny

Bufor lityczny I	30 ml
Lizozym 25 mg/ml, lizosafina 25 mg/ml	1,6 ml
Bufor dla Sma I	65 ml
Enzym restrykcyjny Sma I (5 U/ μ l)	300 μ l

Moduł standardowy

Standard Lambda Ladder
Bloczki kontrolne – grupa 1

Inne odczynniki

Pulsed Field Certified Agarose
Low Melt Preparative Grade Agarose
Roztwór bromku etydyiny (1mg/ml)
10 \times TBE bufor (TRIS/BASE 108 g, kwas borny 55g, EDTA 9,3g;
woda destylowana do 1l).

Izolacja chromosomalnego DNA - przygotowanie bloczków agarozowych (Bio-Rad).

1. Pojedynczą kolonię z całonocnej hodowli badanego szczepu na podłożu krwawym zawieszono w 3 ml podłoża płynnego TSB i inkubowano przez 16-20 godzin w temperaturze 37⁰C z wytrząsaniem.
2. W kuchence mikrofalowej rozpuszczono agarozę do zatapiania (ok. 20 sekund, pełna moc). Umieszczono agarozę w temperaturze 50-55⁰C i pozostawiono do czasu zakończenia przygotowywania bloczków.
3. Odpipetowano 90 µl każdej z hodowli do probówek typu Eppendorf. Zwirowano komórki przez 1-2 minuty przy obrotach 10-12 tys. rpm. Odciągnięto supernatant.
4. Osad zawieszono w 150 µl buforu do zawieszania komórek. Umieszczono zawiesinę bakeryjną i ogrzano w temperaturze 50⁰C (nie dłużej niż 15 minut).
5. Ten etap był wykonany oddzielnie dla każdego izolatu. Do zawiesiny komórek dodano 6µl lizozymu/lizostafiny i 150 µl agarozy do zatapiania. Wymieszano delikatnie pipetując. Natychmiast odpipetowano 100 µl mieszaniny i przeniesiono do jednej studzienki w foremce. Dla każdej próbki napełniono dwie studzienki.
6. Pozostawiono agarozę by skrzepła na 15-20 minut w temperaturze pokojowej.
7. Dla każdego izolatu przygotowano jałową probówkę typu Eppendorf i dodano 500 µl buforu do lizy I oraz 20 µl lizozymu/lizostafiny.
8. Zestalone bloczki przenoszono do roztworu lizującego. Łagodnie wymieszano. Inkubowano bloczki w 37⁰C przez 1 godzinę bez wytrząsania.
9. Po inkubacji usunięto bufor lityczny i przepłukano bloczki w 1 ml 1x buforze do płukania (1x WB).
10. Do każdej próbki dodano 500 µl buforu dla proteinazy K oraz 20 µl proteinazy K. Łagodnie wymieszano. Inkubuj bloczki w 50⁰C przez 16-20 godzin bez wytrząsania.

11. Po inkubacji usunięto roztwór proteiny K. Przepłukano bloczki w 1 ml 1x WB przez 30-60 minut w temperaturze pokojowej z delikatnym wytrząsaniem na kołysce laboratoryjnej. Czynność tę powtarzano jeszcze trzykrotnie.

12. Bloczki mogą być przechowywane przez okres od 3 do 6 miesięcy w temp. 4°C. W tym celu usunięto zużyty bufor do płukania i dodano świeży bufor 1x WB.

Trawienie enzymem restrykcyjnym *Sma*I.

1. Przeniesiono jeden z bloczków do nowej probówki typu Eppendorf. W identyczny sposób przeniesiono fragment bloczka kontrolnego by mieć pewność, iż etap trawienia restrykcyjnego przebiegał prawidłowo. Dodano 1ml 0.1x WB do każdej probówki. Płukano bloczki w temperaturze pokojowej przez 30-60 minut łagodnie je wytrząsając.

2. Usunięto bufor i dodano 500µl buforu dla *Sma* I. Płukano bloczki w temperaturze pokojowej przez 30-60 minut łagodnie je wytrząsając.

3. Usunięto bufor i dodano 300 µl buforu dla *Sma* I. Do każdej probówki dodano 5 µl (25 jednostek na bloczek) enzymu (sekwencja DNA rozpoznawna przez *Sma* I - CCC↓GGG), wymieszano delikatnie postukując w probówkę. Inkubowano próbki w temperaturze 25°C przez 16-20 godzin (całą noc).

4. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym usunięto bufor i dodano 500 µl 1x WB. Bloczki można było przechowywać od 2 do 4 tygodni w temp. 4°C.

Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE)

1. Przygotowano 1% żel agarozowy w buforze 0,5 × TBE. Rozpuszczono agarozę w kuchenie mikrofalowej i ostudzono żel do temp. 55°C.

2. Uszczelniono tackę i zamontowano grzebień w odległości ok. 5 mm od krawędzi.

3. Wylano agarozę na tackę i żel pozostawiono do zastygnięcia.

4. Po zastygnięciu żelu wyjęto grzebień i przeniesiono bloczki (o wymiarach 2,5 wysokości × 5 mm szerokości lub 2,5 mm x 8 mm w zależności od wielkości żelu) do studzienek w żelu. W pierwszej i ostatniej studzience umieszczono standard

wielkości λ Ladder o wielkości od 50 tyś. do 1 mln par zasad. W drugiej studzience umieszczono kontrolny szczep *S. aureus* (Bio-Rad).

5. Po nałożeniu wszystkich bloczków do studzienek, studzienki zalewano 1 % żelem agarowym lub agarozą Low Melt Preparative Grade Agarose (Bio-Rad), poczekano do jej zastygnięcia i umieszczono żel w aparacie do elektroforezy pulsowej.
6. Napełniono aparat buforem 0,5 ×TBE do wysokości ok. 2 cm, włączono przepływ buforu i chłodzenie (temp. 12°C).
7. Elektroforezę prowadzono przez 24 godz. w następujących warunkach:

	b – 1	b-2
Napięcie	5v/cm	6v/cm
Natężenie prądu	110-120 mA	110-120 mA
Temperatura	12°C	12°C
Początkowy czas impulsu	5s	20s
Końcowy czas impulsu	12s	60s
Czas rozdziału	11godz.	13 godz.

Wybarwienie i fotografowanie żelu

1. Po zakończeniu rozdziału, żel barwiono roztworem bromku etydyny (5 kropli stężonego roztworu bromku etydyny 1 mg/ml dodano do ok. 300 ml wody dejonizowanej) przez 15 min.
2. Przeniesiono żel do naczynia z minimum 500 ml wody dejonizowanej i odbarwiano żel przez 30-60 minut. Dłuższe odbarwianie może pomóc w redukcji tła.

3. Żel oglądano i fotografowano w świetle UV przy użyciu transiluminatora (Bio-Rad) i programu „Gel Doc 2000” (Bio-Rad).

Interpretacja uzyskanych wzorów restrykcyjnych DNA izolowanych szczepów (58, 98, 140)

W analizie porównawczej wzorów restrykcyjnych badanych szczepów można wyróżnić kilka kategorii wg Tenovera:

Grupa I: szczepy nierozróżnialne – wzory elektroforetyczne są identyczne, brak różnic we wzorze. Można je oznaczyć identycznym symbolem (np. A1, do An).

Grupa II: szczepy blisko spokrewnione - różnica jednego wydarzenia genetycznego (insercja, delecja) 1-3 różnice we wzorach restrykcyjnych. Izolaty można oznaczyć jako podtypy (np. A1, do An).

Grupa III: szczepy potencjalnie spokrewnione – różnica dwóch wydarzeń genetycznych, 4-6 różnic we wzorach restrykcyjnych. Izolaty można oznaczyć jako podtypy (np. A1, do An). W interpretacji należy uważnie przeanalizować wszystkie dowody nie-genetyczne.

Grupa IV: szczepy niespokrewnione- różnica trzech lub więcej wydarzeń genetycznych, 7 lub więcej różnic we wzorach restrykcyjnych. Szczepy uznawane są za różne (np. typ B).

Różnica we wzorze restrykcyjnym jest definiowana jako obecność lub brak pojedynczego prążka w analizowanym wzorze w porównaniu do szczepu wyjściowego.

Kategorie te, odnoszą się do wzorów restrykcyjnych składających się co najmniej z 10 prążków.

Powyższe kryteria interpretacji dotyczą oceny wyników PFGE szczepów uzyskiwanych podczas badań epidemiologicznych lub z zakażeń szpitalnych w stosunkowo krótkim czasie (1-3 miesiące).

3.4 Hodowla komórek epitelialnych Caco-2 i endotelialnych NHDMEC(Normal Human Dermal Microvascular endothelial cells)

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute

1. Przygotowano wzbogacone podłoże (Complete medium) dla komórek Caco-2.

Skład:

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Media (Sigma)
 FCS 10% Fetal Calf Serum (inaktywowana płodowa surowica cielęca) (Sigma)
 L-Glutamine 2 nM (Sigma)
 Antibiotic/Antimicotic 1% (Sigma)

Przygotowano wzbogacone podłoże MV dla komórek endotelialnych (NHDMEC) (PromoCell),

Skład:

ECGS/H (Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix)	0,4%
FCS	2%
Epidermalny czynnik wzrostowy (EGF)	0,1 ng./ml
Hydrokortyzon	1 µg/ml
Podstawowy czynnik fibroblastów (basic Fibroblast Factor)	1ng/ml
Amfoterycyna B	50 ng/ml
Gentamycyna	50 µg/ml

2. Przepłukano dwa razy pojedynczą warstwę komórek (monolayer) płynem do płukania HBSS (Hanks Balanced Salt Solution – Sigma) – ok. 20 ml.
3. Dodano odpowiednią ilość trypsyny/EDTA (Sigma) – 7 ml do płaskiej butelki (75 cm² flask - Corning) i pozostawiono w inkubatorze o temp. 37°C i w 5 % CO₂.
4. Delikatnie wstrząsnęto butelką w celu oderwania komórek od podłoża i w ten sposób uwolniono komórki do roztworu.
5. Po inkubacji odciągnięto zawiesinę komórkową przy użyciu sterylnej pipety 10ml i przeniesiono całość do probówki (20 ml).
6. Dodano Complete Medium do objętości 20 ml, w celu dezaktywacji trypsyny. Całość wymieszano używając 3 ml sterylnej kapilary.

7. Zwirowano komórki w 1000 rpm przez 2 min w temp 24°C.
8. Odciągnięto supernatant do objętości 5 ml i ponownie zawieszono komórki w podłożu wzbogaconym (Complete Medium). Całość zmieszano przy użyciu 3 ml jałowej kapilary.
9. Z powstałej zawiesiny komórek pobrano próbkę i w komorze Bürkera (Haemocytometer) oceniono liczebność komórek.
10. Porcje zawiesiny zawierającej ok. 1×10^5 lub 1×10^6 komórek/ml przeniesiono do odpowiednich naczyń hodowlanych typu flask (Corning) lub płytek Petry'ego (Corning).



Fot 1. Hodowla komórek Caco-2 w butelce płaskiej (Corning)

Określenie liczebności komórek przy użyciu komory Bürkera (Haemocytometer Cell Counting)

1. Zdezynfekowano komorę 70 % alkoholem etylowym.
2. Nałożono szkiełko nakrywkowe w taki sposób, aby były widoczne pierścienie Netwona.
3. Niewielką ilość zawiesiny komórkowej umieszczono w komorze.
4. Pod mikroskopem uwidoczniono dwa kwadraty, otoczone wzdłuż boków trzema liniami i podzielone na 25 małych kwadratów, które z kolei były podzielone na jeszcze 16 mniejszych kwadratów.
5. Policzono komórki wewnątrz potrójnych linii, używając zasady „triple line rule”. Policzono komórki dotykające górnego i lewego boku kwadrata, natomiast nie

liczono komórki dotykające dolnego i prawego boku. W ten sposób unikniono podwójnego liczenia komórek.

6. Policzono następnie średnią i pomnożono ją przez 10^4 , co pozwoliło uzyskać ilość komórek na 1 ml.

Następnie odpowiednią ilość zawiesiny komórkowej przeniesiono do naczynia hodowlanego typu flask i dodano 20 ml wzbogaconego podłoża.

Inkubowano komórki Caco-2 w 37°C i 5 % CO_2 .

3.5 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus* – typ dzikim (25923) i mutantem (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute.

1. Przygotowano hodowle bulionową *Staphylococcus aureus* typ dziki (25923) lub mutant (10832) z ATCC: do probówki z 10 ml podłoża płynnego BHI wprowadzono jedną kolonię z hodowli na płycie agarowej z dodatkiem krwi, wymieszano w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny.
2. Hodowlę bulionową umieszczono na wytrząsarce rotacyjnej, wykonującej 100 obrotów/minutę, w temp. 37⁰C i pozostawiono na całą noc.
3. Po 24h inkubacji do probówki z 10 ml podłoża płynnego BHI wprowadzono 300 μ l z hodowli całonocnej i zmierzono gęstość optyczną spektrofotometrycznie hodowli przy długości fali $\lambda = 660\text{nm}$.
Gęstość optyczną mieszaniny bakteryjnej mierzono aż do momentu osiągnięcia wartości OD= 1.1 –1.2 (po czasie ok. 3 godzin). Spodziewana gęstość bakterii powinna wynieść wartość 10⁹ CFU/ml.
Następnie hodowlę bulionową przeniesiono do wytrząsarki rotacyjnej, wykonującej 100 obrotów na minutę w temp. 37⁰C.
4. Przygotowano komórki do inkubacji z bakteriami. W tym celu komórki epitelialne Caco-2 (pasaż 25-29) przepłukano 2 razy płynem do płukania HBSS i dodano do każdej szalki Petry' ego (35 mm) po 1800 μ l DTS (podłoże hodowlane bez antybiotyków: DMEM + 2 nM L-Glutamine, Transferrin 5 μ g/ml, Sodium Selenite 0,2 μ g/ml). Pre-inkubacja trwała co najmniej 2 godziny przed właściwym doświadczeniem.
5. Po osiągnięciu żądanej wartości OD, probówki z hodowlą bulionową zwirowano przy obrotach 2000 rpm przez 3 minuty.
Po zwirowaniu, supernatant usunięto i dodano 2 ml DTS, całość zmieszano i przygotowano seryjne rozcieńczenia.
6. Do probówek dodano 180 μ l DTS i wykonano rozcieńczenie przez dodawanie do każdej następnej probówki 20 μ l z poprzedniej 200 μ l dokładnie zmieszanej mieszaniny bakteryjnej.

Do pierwszej probówki dodano 200 μ l wyjściowej hodowli bakteryjnej, co stanowiło stężenie wyjściowe (10^0). W serii rozcieńczeń do następnej probówki dodano 20 μ l wyjściowej hodowli bulionowej.

W ten sposób otrzymano rozcieńczenie wyjściowej hodowli bulionowej od 10^{-1} do 10^{-8} .

Kontrolę stanowiła probówka z 200 μ l DTS bez komórek bakteryjnych.

7. Przygotowane rozcieńczenia dodano do szalek Petry'ego (35 mm) z kom. Caco-2 i 1800 μ l DTS. Próba kontrolną była szalka z 2 ml DTS bez komórek bakteryjnych. Całość inkubowano przez 2-3 godzin w temp. 37°C i 5 % zawartości CO_2 .

8. W celu sprawdzenia stężenia komórek bakteryjnych w wyjściowej zawieszynie bakteryjnej sporządzono kolejną serię rozcieńczeń.

Przygotowano probówki z 900 μ l PBS (Sigma) i rozpoczęto rozcieńczenie przez dodanie do pierwszej probówki 100 μ l wyjściowej mieszaniny bakteryjnej, całość dokładnie zmieszano. Następnie do kolejnych probówek z 900 μ l PBS dodawano po 100 μ l mieszaniny z poprzedniej probówki.

W ten sposób uzyskano rozcieńczenie od 10^{-1} do 10^{-9} .

Z każdej probówki pobrano 20 μ l mieszaniny i umieszczono na płytce Petry'ego z podłożem krwawym. Następnie płytki inkubowano w cieplarni, w temp. 37°C przez 4 godziny.

Kolejnym etapem doświadczenia była:

- Ø Izolacja RNA z komórek Caco-2
- Ø Odwrotna transkrypcja
- Ø Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCR (semi- quantitative Reverse Transcriptase Polymrerase Chain Reaction).

3.6 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus* 25923 – typem dzikim z ATCC w zależności od czasu trwania inkubacji

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute.

Przebieg eksperymentu przeprowadzono identycznie jak w pkt 1-4 w doświadczeniu: Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus* – typ dzikim (25923) i mutantem (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.

5. Po osiągnięciu żądanej wartości OD, próbówki z hodowlą bulionową zwirowano przy obrotach 2000 rpm przez 3 minuty.
Po zwirowaniu, supernatant usunięto i dodano 2 ml DTS, całość dokładnie zmieszano.
6. 200 µl hodowli bulionowej dodano do szalek Petry'ego (35 mm) z komórkami Caco-2 i 1800 µl DTS. Próba kontrolną była szalka z 2 ml DTS bez komórek bakteryjnych. Całość inkubowano przez kolejno 1, 2, 3, 4 godziny w temp. 37⁰C i 5 % zawartości CO₂.
7. W celu sprawdzenia stężenia wyjściowego zawiesiny bakteryjnej sporządzono serię rozcieńczeń tak jak w pkt.8 w podrozdziale 3.5.

Kolejnym etapem doświadczenia była ocena akumulacji transkryptów cytokin: IL-8, TNF-α:

- Ø Izolacja RNA z komórek Caco-2
- Ø Odwrotna transkrypcja
- Ø Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCR (semi- quantitative Reverse Transcriptase Polymrerase Chain Reaction).

3.7 Izolacja RNA z komórek Caco-2 przy użyciu Clontech Nucleospin RNA II kit (BD Biosciences)

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute.

Wymagane warunki hodowli: maksymalnie 6×10^6 komórek /ml w szalkach o średnicy 35mm

Zestaw NucleoSpin RNA II kit zawiera:

50	Kolumnienki z filtrem - NucleoSpin RNA Spin Columns (blue)
150	Probówki do kolekcji RNA - 2-ml Collections Tubes
50	Probówki typu Eppendorf - 1.5-ml Microcentrifuge Tubes
1 fiolka	Enzym DNazy I (liofilizowany, wolny od RNaz)
7 ml	Bufor reakcyjny do DNazy I
25 ml	Bufor RA1 (bufor lityczny)
15 ml	Bufor RA2 (bufor płuczący I)
12.5 ml	Bufor RA3 (bufor płuczący II)
25 ml	Bufor MDB (Membrane Desalting Buffer)
15 ml	Woda wolna od nukleaz

Przed rozpoczęciem izolacji:

Do buforu RA1 dodano 10 μ l β - Mercaptoetanol (Merck) na każdy ml buforu RA1.

Do buforu RA3 dodano odpowiednią ilość 95% etanolu.

Protokół do badania wg NucleoSpin RNA II Protocols (BD Biosciences).

1. Usunięto supernatant i przepłukano komórki w buforowanym roztworze soli fizjologicznej PBS (Sigma). Następnie usunięto PBS i dodano 350 μ l buforu RA1 z β -mercaptoetanołem (Merck).
2. Zawiesinę przeniesiono do probówki typu Eppendorf wolnej od RNaz zawierającej 350 μ l 70% etanolu i następnie przy użyciu strzykawki i igły(19G) wymieszano dokładnie składniki zawiesiny (zawartość przeciągnięto przez strzykawkę 4 do 6 razy).

3. Przeniesiono zawiesinę do kolumniek typu Nucleospin column, która znajduje się w 2 ml probówkach typu Collection tube (ok. 700 μ l) i wirowano przez 30s przy 8000g. Po skończeniu wirowania wyrzucono pozostałość znajdującą się na filtrze.
4. Dodano 350 μ l buforu MDB i wirowano przez 1 min przy 11000g. Po skończeniu wirowania wyrzucono pozostałość znajdującą się na filtrze.
5. Przygotowano mieszaninę reakcyjną DNazy1 w probówkach typu Eppendorf wolnych od RNaz. Na jedną próbkę użyto 10 μ l DNazy1 i 90 μ l buforu reakcyjnego do DNazy I.
6. Dodano 95 μ l mieszaniny reakcyjnej DNazy1 do każdej kolumnieki typu Nucleospin column i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
7. Następnie dodano 200 μ l buforu RA2 i wirowano przez 30 s przy 8000 g. Po skończeniu wirowania wyrzucono pozostałość znajdującą się na filtrze.
8. Przeniesiono kolumnieki typu Nucleospin column do nowej probówki typu 2 ml Collection tube i dodano 600 μ l buforu RA3 i wirowano przez 30 s przy 8000g. Po skończeniu wirowania wyrzucono pozostałość znajdującą się na filtrze.
9. Dodano 250 μ l buforu RA3 i wirowano przez 30s przy 8000g, po skończeniu wirowania wyrzucono pozostałość znajdującą się na filtrze i wirowano przez 2min przy 11000g, wyrzucono probówkę typu Collection tube i przeniesiono kolumnieki typu Nucleospin column do probówki typu Eppendorf wolnej od RNaz.
10. Eluowano RNA przez dodanie 50 μ l wody wolnej od nukleaz i wirowano przy maksymalnej prędkości przez 1 minutę. Następnie dodano 50 μ l wody wolnej od nukleaz i wirowano przez 1 min przy 11000g.

Pomiar ilości RNA przy użyciu spektrofotometru UV
(Pharmacia Biotech Gene Quant II, RNA-DNA calculator)

Do sterylnej probówki typu Eppendorff dodano 5 μ l RNA i 395 μ l 10mM buforu fosforanu sodu (sodium phosphate buffer pH= 8.0).

Ustawienia Pharmacia Biotech Gene Quant II:
długość toru (path length) = 10
współczynnik rozcieńczenia (dilution factor) = 80

W celu kalibracji użyto 400 μ l 10 mM buforu fosforanu sodu.

Po kalibracji przepłukano kuwetę wodą z dodatkiem dieetylopirowęglaanu (woda DEPC – diethyl pyrocarbonate) i rozpoczęto pomiar właściwych próbek. Odczytano absorbancje , współczynnik i stężenie RNA. Po każdym pomiarze przepłukiwano kuwetę wodą DEPC.

Wodę DEPC przygotowano w następujący sposób:

Do 4 ml wody dwukrotnie dejonizowana dodano 4 μ l dietylopirowęglaanu (Merck). Tak przygotowany roztwór pozostawiono na co najmniej 4 godz. Po tym okresie wodę DEPC poddano procesowi sterylizacji w autoklawie przez 20 min. w temp.120°C.

Elektroforeza RNA

Przygotowano 1% żel agarozowy:

100 ml TAE

1g agarozy

100 μ l bromku etydyny

1. Przygotowano 1% żel agarozowy w buforze TAE: rozpuszczono 0.4g lub 1g agarozy w 40 ml lub 100 ml 1 \times TAE.
2. Rozpuszczono agarozę w kuchence mikrofalowej.
3. Schłodzono roztwór do temperatury ok.70°C.
4. Dodano 40 μ l roztworu bromku etydyny (EtBr) 0.5 mg/ml.
5. Podczas chłodzenia agarozy przygotowano aparat do elektroforezy – uszczelniono płytkę.
6. Wylano żel na płytkę, zamontowano grzebienie.
7. Żel pozostawiono do zastygnięcia.
8. Po zastygnięciu żelu wyjęto grzebienie i płytkę z żelem umieszczono w komorze do elektroforezy i zalano buforem 1 \times TAE ok. 3mm nad powierzchnią żelu.
9. Przygotowano próbki: zmieszano 2 μ l rozpuszczonego RNA z 8 μ l wody z dodatkiem dietylopirowęglaanu i 2 μ l rozcieńczonego barwnego roztworu obciążającego (500 μ l glicerol, 100 μ l sześciokrotnie stężonego barwnego roztworu obciążającego - Promega, 20 μ l 50 \times TAE, 380 μ l woda DEPC).
10. Całą objętość próbki RNA nałożono do studzienek żelu (po 12 μ l na studzienkę), do pierwszej studzienki nałożono marker λ (Promega).
11. Połączono komorę z zasilaczem i prowadzono rozdział przy napięciu 80-100 mV przez ok. 60-90 min.
12. Gdy barwnik w żelu znalazł się w pobliżu przeciwległego końca płytki, wyłączono zasilanie.
13. Po zakończeniu elektroforezy żel podświetlono promieniami UV i oglądano przy użyciu kamery Bio-Rad.

3.8 Odwrotna transkrypcja (Reverse transcription – RT)

Kellog Laboratory, The Rowett Reserach Institute

RNA wyizolowano używając zastaw: Clontech Nucleospin II RNA extraction kit.

Stężenie i współczynnik RNA oszacowano przy użyciu Pharmacia Biotech GeneQuant II, do 5µl próbki RNA dodano w 395 µl 10 mM buforu fosforanu sodu pH=8.

W reakcji odwrotnej transkrypcji, tak uzyskane RNA stanowi matrycę do utworzenia pojedynczej, komplementarnej nici cDNA, które w dalszym etapie jest niezbędne do przeprowadzenia półilościowej RT-PCR (Semi -quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).

Ilość RNA potrzebna do prawidłowego przebiegu reakcji była obliczona na podstawie danych z Pharmacia Biotech GeneQuant II.

Wymaganą ilością RNA było 500 ng każdej próbki, co pozwoliło uzyskać 100 µl cDNA.

Mieszanina reakcyjna nr 1:

Wymagana ilość mieszaniny reakcyjnej na 1 próbkę:

0.5 µl	Oligo dT primer (Promega)
0.5 µl	mieszanina deoksynukleotydów 10mM dNTP's

Zmieszano składniki i zwirowano.

Do każdej próbki RNA dodano 1 µl mieszaniny reakcyjnej nr 1.

Próbki wstawiono do termocyklera na 5 minut w temp. 65°C.

Po tym czasie wyjęto próbki z termocyklera i przełożono na lód.

Przygotowano mieszaninę reakcyjną nr 2:

Wymagana ilość mieszaniny reakcyjnej na 1 próbkę:

2 μl $5 \times 1^{\text{st}}$ strand buffer (250 mM Tris-HCl pH=8.3 temp. pok. 375 mM KCl, 15 mM Mg Cl₂ – Invitrogen)

1 μl 0.1M DTT (1,4 – Dithio – DL – threitol Invitrogen)

0.5 μl inhibitor rybonukleaz Rnasin (Promega)

0.5 μl odwrotna transkryptaza Superscript II (Invitrogen)

Zmieszano składniki i zwirowano.

Do każdej próbki RNA dodano 4 μl mieszaniny reakcyjnej nr 2.

Próbki wstawiono do termocyklera na 52 minut w temp. 42 °C i następnie w 70 °C przez 15 minut.

Po tym czasie dodano 0.5 μl RNase H -Ribonuclease H (Promega) i wstawiono próbki do termocyklera na 37 °C przez 20 minut.

Po reakcji odwrotnej transkrypcji próbki przygotowano do reakcji półilościowej polimerazowej reakcji łańcuchowej dodając 90 μl wody DEPC.

3.9 Półilościowa, odwrotnie transkrybowana polimerazowa reakcja łańcuchowa
(Semi - quantitative RT-PCR Reverse Transcriptase Polymrerase Chain Reaction)

KellogLab, The Rowett Research Institute

Po odwrotnej transkrypcji 10 μ l cDNA (ekwiwalent 500 ng RNA) zastosowano do półilościowej, odwrotnie transkrybowanej polimerazowej reakcji łańcuchowej.

Do każdej reakcji użyto:

1.25u polimerazy Taq (termostabilnej polimerazy DNA z *Thermus aquaticus*) (Sigma)

5 μ l 10 \times bufor (100mM Tris-HCl, pH= 8.3, 500 mM KCl) (Sigma)

1 μ l 10 mM dNTP (Deoxynucleotide Mix - 10 mM dATP, 10 mM d CTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP) (Sigma)

10 μ l 5M Betaine (Sigma)

3 μ l 25 mM MgCl₂ (co daje końcowe stężenie 1.5 mM) (Sigma)

5 μ l primer sensowny (10pmol/ μ l) (Sigma – Genosys)

5 μ l primer antysensowny (10pmol/ μ l) (Sigma – Genosys)

woda DEPC (do objętości 50 μ l)

PCR przeprowadzono w MJ Research PTC 200 Deltier Thermal Cycler.

Mieszanina polimerazy Taq

Przygotowano mieszaninę dla trzech próbek:

3 \times 1.25u (aktywność enzymu niezbędna do każdej reakcji)= 3.75u

3 \times 5 μ l (objętość mieszaniny wymagana do każdej reakcji)= 15 μ l

3.75u polimerazy Taq na 15 μ l mieszaniny reakcyjnej.

Stężenie wyjściowe polimerazy Taq wynosi: 5u/ μ l

Wymagana ilość polimerazy Taq do reakcji PCR: 0.75 μ l

Skład mieszaniny Taq mix – 15 μ l:

0.75 μ l Taq

1.5 10 \times bufor

12.2 μ l woda DEPC

Mieszanina „Master Mix”

Przygotowano mieszaninę dla trzech próbek:

35 μ l mieszaniny „Master Mix” jest potrzebne na każdą próbkę, w tym przypadku 105 μ l.

10 \times bufor 15 μ l

10mM dNTP 3 μ l

5M Betaine 30 μ l

25 mM MgCl₂ 9 μ l

forward primer (10pmol/ μ l) 15 μ l

primer sensowny

reverse primer (10pmol/ μ l) 15 μ l

primer antysensowny

woda DEPC 18 μ l

Sekwencja primeru sensownego genu referencyjnego - GAPDH(forward primer):

5' – ACCACAGTCCATGCCATC – 3'

Własności fizyko-chemiczne:

7,6 OD T_m = 62,2⁰C

243,6 μ g 32,1 μ g/OD

45,2 nmol MW = 5388

Sekwencja primeru antysensownego GAPDH (reverse primer):

5' – TCCACCACCCTGTTGCTGTA – 3'

Własności fizyko – chemiczne:

21,4 OD T_m = 66,6⁰C

726,5 μ g 34,0 μ g/OD

121,0 nmol MW = 6004

Primer sensowny dla IL-8:

5' – CTGCAGCTCTGTGTGAAGGTGC – 3'

Własności fizyko – chemiczne:

8,3 OD $T_m = 69,6^{\circ}\text{C}$

277,1 μg 33,5 $\mu\text{g}/\text{OD}$

40,9 nmol MW = 6782

Primer antysensowny dla IL-8:

5' – CTCCACAACCCTCTGCACCA – 3'

Własności fizyko – chemiczne:

8,9 OD $T_m = 71,8^{\circ}\text{C}$

303,7 μg 34,0 $\mu\text{g}/\text{OD}$

48,9 nmol MW = 6216

Primer sensowny dla TNF- α :

5' –GCCAAYGCCCTCCTGGCCAAYGGC– 3'

Y= C,T

Własności fizyko – chemiczne:

15,5 OD $T_m = 81,1^{\circ}\text{C}$

535,9 μg 34,5 $\mu\text{g}/\text{OD}$

73,8 nmol MW = 7260

Primer antysensowny dla TNF- α :

5' –CTCCAGCTGGAAGACYCCTCCCAG– 3'

Własności fizyko – chemiczne:

15,04 OD $T_m = 72,2^{\circ}\text{C}$

510,1 μg 33,1 $\mu\text{g}/\text{OD}$

70,3 nmol MW = 7251

Do 10 μl cDNA dodano 35 μl mieszaniny Master Mix i włożono próbki do termocyklera na 5 min w temp. 95°C . W tym czasie dodano odpowiednią ilość polimerazy Taq do mieszaniny reakcyjnej.

Po 5 min. próbki przeniesiono do termobloku o temp. 70°C i dodano po 5 µl mieszaniny Taq Mix do każdej próbki.

Następnie próbki ponownie wstawiono do termocyklera.

Reakcję PCR dla genu referencyjnego - GAPDH prowadzono w termocyklerze zgodnie z następującym profilem termicznym:

1. 95°C na czas nieokreślony.
2. 95°C 5 min
3. 72 °C na czas nieokreślony.
4. 95 °C 30 sec (temperatura denaturacji).
5. 54 °C 30 sec (temperatura asocjacji primerów do matrycy).
6. 72 °C 1 min (temperatura polimaryzacji).
7. Powrót do pkt.4 i powtórzenie cyklu 19 razy.
8. Zatrzymanie cyklu w temp.70°C
9. 95°C 30 sec.
- 10.72°C 1 min.
- 11.Powrót do pkt. 7 i powtórzenie cyklu 4 razy.
- 12.Zatrzymanie cyklu w temp.70 °C

W półilościowej polimerazowej reakcji łańcuchowej 10 µl każdej próbki powinno być pobrano do probówki typu 0.5 ml Eppendorf po 20 cyklach, następnie po kolejnych 5 cyklach i zakończono reakcję po następnych 5 cyklach.

Elektroforeza produktów PCR

1. Przygotowano 2% agarozę: 2g agarozy dodano do 100 ml buforu 1× TAE.
2. Rozpuszczono agarozę w kuchenie mikrofalowe (1-2 min).
3. Ostudzono żel do temp. ok. 70 °C .
4. Dodano 20 µl 0.5 mg/ml bromku etydyyny.
5. Uszczelniono tackę, wylano agarozę i usatwiono grzebienie.
6. Po zastygnięciu żelu wyjęto grzebienie i wstawiono tackę z żelem do aparatu do elektroforezy.

7. Napełniono aparat buforem TAE do wysokości 3mm nad powierzchnią żelu.
8. Przygotowano próbki: dodano 2 μ l roztworu obciążającego (500 μ l glicerol, 100 μ l Promega 6 \times loading dye, 20 μ l 50 \times buforu TAE i 380 μ l wody DEPC).
9. Nałożono próbki do studzienek żelu (po 12 μ l na studzienkę), do jednej studzienki nałożono marker wielkości fragmentów DNA (100 bp DNA Ladder, Promega).
10. Włączono zasilanie ze stabilizatora prądu do aparatu elektroforezy (100V)
11. Zatrzymano rozdział gdy barwnik żelu znalazł się w odległości 1 cm od dolnej krawędzi żelu.
12. Po zakończeniu elektroforezy żel podświetlono promieniami UV i oglądano przy użyciu kamery Bio-Rad.
13. Żel analizowano przy użyciu programu Quantity One (Bio-Rad).

3.10 Działanie bakteriobójcze gentamycyny i lisostafiny na wyselekcjonowane szczepy kliniczne.

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute.

Przebieg eksperymentu jest identyczny jak w pkt. 1-5 w doświadczeniu:

Badanie adherencji i inwazji *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutanta (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 oraz badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki epitelialne Caco-2.

6. Inkubacja bakterii z gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml przez 2 i 4 godziny.

Do probówki typu Eppendorf dodano 900 µl DTS z gentamycyną (100 µg/ml) i 100 µl zawiesiny bakteryjnej. Całość dokładnie wymieszano.

7. Inkubacja bakterii z lisostafiną o stężeniu 20 µg/ml przez 1 godzinę.

Postępowano tak samo jak w poprzednim punkcie.

8. Po inkubacji 100 µl zawiesiny bakteryjnej umieszczono na szalce Petr'ego

z podłożem krwawym i dokładnie rozprowadzono po całej powierzchni podłoża.

9. Wszystkie płytki inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez 24 godziny.

3.11 Badanie adherencji i inwazji *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 oraz badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki epitelialne i endotelialne.

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute.

1. Przygotowano hodowle bulionową *S. aureus* wybranego typu (typ dziki 25923 lub mutantą 10832 z ATCC albo wybrany szczep kliniczny) lub *S. enteritidis*: do probówki z 10 ml podłożem płynnym (BHI w przypadku gronkowca lub LB w przypadku *S. enteritidis*) wprowadzono eż jedną kolonię z hodowli na płytce agarowej z dodatkiem krwi, wymieszano w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny.
2. Hodowlę bulionową umieszczono na wytrząsarce rotacyjnej, wykonującej 100 obr./min., w temp. 37°C i pozostawiono na całą noc.
3. Po 24h inkubacji do probówki z 10 ml podłoża płynnego BHI wprowadzono 300 µl hodowli całonocnej *S. aureus* do probówki z 10 ml podłoża płynnego BHI lub 600 µl hodowli całonocnej *S. enteritidis* do 10 ml LB. Zmierzono gęstość optyczną hodowli spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 660\text{nm}$ dla *S. aureus* i $\lambda = 600\text{nm}$ dla *S. enteritidis*. Następnie hodowlę bulionową przeniesiono do wytrząsarki rotacyjnej (100 obr./min w temp. 37°C).
4. Gęstość optyczną mieszaniny bakteryjnej mierzono ok. 3 godzin dla *S. aureus*, aż do osiągnięcia wartości $OD \approx 1,0-1,2$ oraz ok. 2 godzin dla *S. enteritidis* do osiągnięcia wartości ($OD \approx 0,8-0,9$). Spodziewana gęstość bakterii dla gronkowców przy w/w wartościach OD, powinna była osiągnąć wartość 10^8-10^{10} CFU/ml, dla *S. enteritidis* 10^8 CFU/ml.
5. Przygotowano komórki do inkubacji z bakteriami. W tym celu komórki Caco-2 (25-29 pasaż) przepłukano 2 razy płynem do płukania HBSS i dodano 1800 µl DTS do każdej szalki Petry'ego (35mm, Corning) . Pre-inkubacja trwała co najmniej 2 godziny.
6. Po osiągnięciu żądanej wartości OD, probówki z hodowlą bulionową zwirowano przy obrotach 2000 rpm przez 3 minuty.
Po zwirowaniu, supernatant usunięto i dodano 2 ml DTS, dokładnie zmieszano całość.
7. 200 µl hodowli bulionowej dodano do każdej szalki Petry'ego. Próba kontrolną była szalka z DTS bez komórek bakteryjnych.

8. Komórki z bakteriami inkubowano przez 2-3 godziny w temp. 37⁰C i 5 % zawartości CO₂.
9. W celu sprawdzenia stężenia wyjściowego komórek bakteryjnych sporządzono serię rozcieńczeń tak jak w pkt.8 podrozdziału 3.5.
10. Po inkubacji komórek z bakteriami komórki przepłukano dwukrotnie w HBSS.
11. W celu zbadania inwazji typu dzikiego (25923) i mutantu (10832) *S. aureus* z ATCC i *S. enteritidis* na komórki Caco-2 dodano do dwóch szalek Petry'ego badanego szczepu 2000 µl DTS z gentamycyną (100 µg/ml) .
Inkubacja z antybiotykiem trwała przez 4 godziny.
W celu zbadania inwazji klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* dodano do komórek 1 ml DTS lizostafiną (20-25 µg/ml).
Inkubacja z lizostafiną trwała 1 godzinę.
12. W celu zbadania adherencji typu dzikiego (25923) i mutantu (10832) *S. aureus* z ATCC i *S. enteritidis* do komórek Caco-2 nie dodano gentamycyny do dwóch kolejnych szalek badanego szczepu.
13. Po inkubacji komórki ponownie przepłukano dwukrotnie w HBSS.
14. W pierwszym doświadczeniu z gronkowcami: typem dzikim (25923) i mutantem (10832) z ATCC dodano 1 ml 1% Triton X. W kolejnych doświadczeniach z wcześniej wymienionymi gronkowcami i *S. enteritidis* oraz szczepami klinicznymi *S. aureus* dodano 500 ml 1% Triton X (Sigma) i 500 ml DTS zamiast 1 ml 1% Triton X, który powodował degradację komórek, zbyt duże jego stężenie mogło także spowodować zniszczenie komórek bakteryjnych.
15. W celu obliczenia stężenia komórek bakteryjnych, wykonano seryjne rozcieńczenia, postępując podobnie jak w punkcie 10.

3.12 Badanie wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych - genistyny na inwazję *Staphylococcus aureus* typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis*.

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute

Przebieg eksperymentu jest identyczny jak w pkt.1-6 w podrozdziale 3.11.

7. Część szalek Petry'ego z komórkami Caco- 2 inkubowano z genistyną o stężeniu 25 μ M przez 1 godzinę.

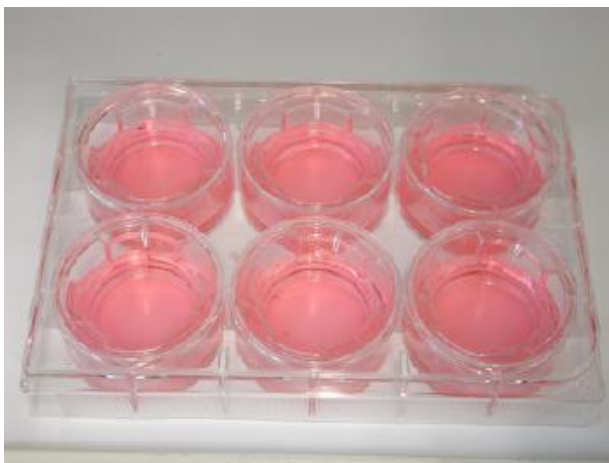
Pozostałe szalki inkubowano z 1 ml DTS bez genistyny.

Dalszy przebieg eksperymentu jest taki sam jak w/w doświadczeniu (od pkt.7 do pkt.15).

3.13 Badanie translokacji bakteryjnej *Staphylococcus aureus*: typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i *Salmonella enteritidis* oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.

Kellog Laboratory, The Rowett Research Institute.

Doświadczenie zostało przeprowadzone na płytkach wielodołkowych składających się z dwóch komór. Górna komora jest ruchoma i od dołu jest ograniczona membraną poliestrową lub poliwęglową (Transwell Corning, Costar) , na której hodowano komórki epitelialne i endotelialne.



Fot 2. Płytką wielodołkowa – dwukomorowa.

Przebieg eksperymentu jest identyczny jak w pkt.1- 5 dośw. w podrozdziale 3.11
Następnie:

6. Przygotowano komórki do inkubacji z bakteriami. W tym celu komórki Caco-2 przepłukano 2 razy płynem do płukania HBSS i dodano DTS do każdego dołka po 1600 μ l do górnej komory i 2 ml do dolnej. Pre-inkubacja trwała co najmniej 2 godziny.
7. Po osiągnięciu żądanej wartości OD, próbówki z hodowlą bulionową zwirowano przy obrotach 2000 rpm przez 3 minuty.
Po zwirowaniu, supernatant usunięto i dodano 2 ml DTS, dokładnie zmieszano całość.
8. Dodano 200 μ l hodowli bulionowej do każdego dołka. Próba kontrolną był dołek z DTS bez komórek bakteryjnych.
9. Komórki z bakteriami inkubowano przez 2-5 godzin dla *Staphylococcus aureus* oraz 3 godz. dla *Salmonella enteritidis* w temp. 37⁰C i 5 % zawartości CO₂.

10. W celu sprawdzenia stężenia wyjściowego komórek bakteryjnych sporządzono serię rozcieńczeń tak jak w pkt. 8 dośw. w podrozdziale 3.5.
11. Po inkubacji komórek z typem dzikim (25923) i mutantem (10832) *Staphylococcus aureus* z ATCC i *Salmonella enteritidis* przepłukano komórki dwukrotnie w HBSS i dodano 1000 µl DTS z gentamycyną (100 µg/ml). Inkubacja z antybiotykiem trwała przez 4 godziny.
W następnych powtórzeniach translokacji bakteryjnej pominięto ten punkt, ze względu na bakteriobójcze działanie na komórki bakteryjne, znajdujące się w dolnej komorze.
Po inkubacji komórek ze szczepami klinicznymi *Staphylococcus aureus* dodano do 1 ml DTS z lizostafiną (25 µg/ml).
Inkubacja z lizostafiną trwała 1 godzinę.
12. Po inkubacji komórki ponownie przepłukano dwukrotnie w HBSS.
13. W doświadczeniu z gronkowcami: typem dzikim (25923) i mutantem (10832) z ATCC dodano do górnej komory 1 ml 1% Triton X. W kolejnych doświadczeniach z wcześniej wymienionymi gronkowcami i *S. enteritidis* oraz szczepami klinicznymi *S. aureus* dodano 500 ml 1% Triton X (Sigma) i 500 ml DTS.
14. W celu obliczenia stężenia komórek bakteryjnych w obu komorach, wykonano seryjne rozcieńczenia, postępując podobnie jak w punkcie 10.

4. WYNIKI

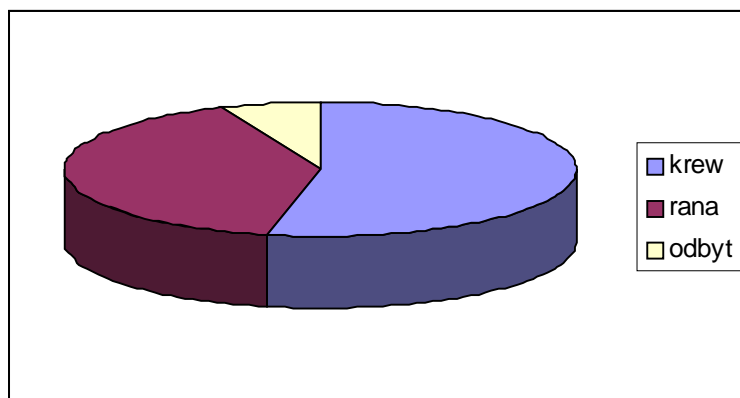
4.1 Analiza materiału.

Analizie ogółem poddano 77 szczepów gronkowców izolowanych z ran (R), krwi (K) i odbytu (O). Szczepy pochodziły od pacjentów hospitalizowanych w latach 2001-2002 na Oddziałach Leczenia Oparzeń. 63 szczepy pochodziły z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS), 5 szczepów z Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P) i 9 szczepów ze Szpitala im. Rydygiera w Krakowie (Rd).

Oddział Oparzeń	Rana (R)	Krew (K)	Odbyt (O)
CLOS	20	40	3
P	3	0	2
Rd	8	1	0

Tab. 11 Pochodzenie wyizolowanych szczepów gronkowca ze względu na materiał diagnostyczny i ośrodek badawczy.

Szczepy gronkowców wyizolowano głównie z krwi – 41 (53,2%), pozostałe uzyskano z wymazów z ran – 31 (40,3%) i odbytu – 5 (6,5%).

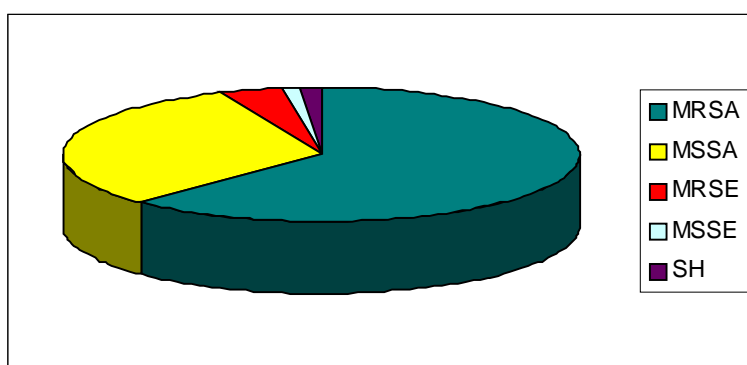


Ryc. 4 Pochodzenie wszystkich szczepów gronkowcowych ze względu na rodzaj materiału.

Wyizolowane gronkowce to:

- Ø gronkowiec złocisty metycylinooporny (MRSA – metycylin resistance *S.aureus*) – 48 szczepów (62,3%)
- Ø gronkowiec złocisty metycylinowrażliwy (MSSA – metycylin sensitive *S.aureus*) – 24 szczepy (31,2%)

- Ø gronkowiec naskórkowy metycylinooporny (MRSE – metycyllin resistance *Staphylococcus epidermidis*)- 3 szczepy (3,9%)
- Ø gronkowiec naskórkowy metycylinowrażliwy (MSSE – metycyllin sensitive *Staphylococcus epidermidis*) – 1 szczep (1,3%)
- Ø *Staphylococcus hominis* – 1 szczep (1,3%)



Ryc. 5 Szczegółowy podział wyizolowanych gronkowców.

Oddział	MRSA	MSSA	MRSE	SE	SH	Suma szczepów
CLOS	47	16	0	0	0	63
P	1	0	3	1	0	5
Rd	0	8	0	0	1	9

Tab. 12 Podział zidentyfikowanych gronkowców pochodzących z Oddziałów Leczenia Oparzeń.

Zidentyfikowane gronkowce pochodzące z Oddziału Leczenia Oparzeń:

- Ø w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich – stanowiły 63 szczepy S.A. w tym 47 szczepy MRSA i 16 szczepów MSSA.
- Ø z Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu – stanowiły 5 szczepów SA i SE w tym 3 szczepy MRSE, 1 szczep MRSA i 1 szczep SE.
- Ø ze szpitala im. Rydygiera – stanowiły 9 szczepów w tym 8 szczepów MSSA i 1 szczep *S. hominis*

Analizie porównawczej poddano szczepy wyizolowane z:

- Ø rany – krwi – odbytu (R-K-O)
- Ø rany – krwi (R-K)
- Ø krwi –odbytu (K-O)

Miejsce izolacji	Liczba szczepów	Numery szczepów i nazwy szczepów
R-K-O	9	58 (MRSA) - 60 (MRSA) - 59 (MRSA) 74 (MRSA) - 72 (MRSA)- 73 (MRSA) 75 (MRSA) – 73 (MRSA)- 71 (MRSA)
R-K	34	3 (MSSA) -4 (MSSA) 6 (MRSA) -5 (MRSA) 7 (MRSA) -8 (MRSA) 14 (MRSA)-12 (MRSA) 16 (MSSA)-15 (MSSA) 18 (MRSA)-17 (MRSA) 19 (MRSA) - 20 (MRSA) 21 (MSSA) - 22 (MRSA) 25 (MRSA) – 26 (MRSA) 43 (MRSA)- 42 (MRSA) 47 (MRSA)- 48 (MRSA) 54 (MRSA)- 53 (MRSA) 62 (MRSA)- 61 (MRSA) 64 (MRSA)- 63 (MRSA) 70 (MRSA) - 69 (MRSA) 77 (MRSA) -76 (MRSA) 79 (MRSA) – 78 (MRSA)
K-O	2	2 (MRSA) -1(MRSA)
R-O	2	30 (MRSE)- 29 (MRSE)

Tab. 13 Analiza porównawcza szczepów wyizolowanych z krwi, rany i odbytu.

Jakiegokolwiek różnice fenotypowe (profil oporności) a zwłaszcza genotypowe pomiędzy szczepami były podstawą do dalszych badań mechanizmu translokacji bakteryjnej.

4.2 Analiza fenotypowa szczepów.

Charakterystyka szczepów gronkowcowych - wyniki

Ocena morfologii kolonii na podłożu krwawym.

Na agarze z krwią wzrost *Staphylococcus aureus* wystąpił w postaci kolonii okrągłych, dużych, gładkich, wypukłych, nieprzezrzystych, o równym brzegu i o masłowatej konsystencji. Najczęściej miały barwę żółtą lub jej odcienie.

Wzrost *Staphylococcus epidermidis* pojawił się w postaci kolonii okrągłych, drobnych, białych, gładkich, wypukłych i nieprzezrzystych.

Typ hemolizy na podłożu agarowym z dodatkiem krwi.

Szczepy z gatunku *Staphylococcus aureus* wywołały hemolizę typu β , pozostałe gatunki z rodzaju *Staphylococcus* nie powodowały hemolizy.

Hodowla na agarze z mannitolem (podłoże Chapmana).

Wokół kolonii gronkowca złocistego było widoczne żółte zabarwienie wokół kolonii lub podłoże całkowicie zmieniło barwę z różowej na żółtą. Widoczne żółte zabarwienie było wynikiem fermentacji mannitolu.



Fot. 3 Hodowla *Staphylococcus aureus* na podłożu Chapmana.



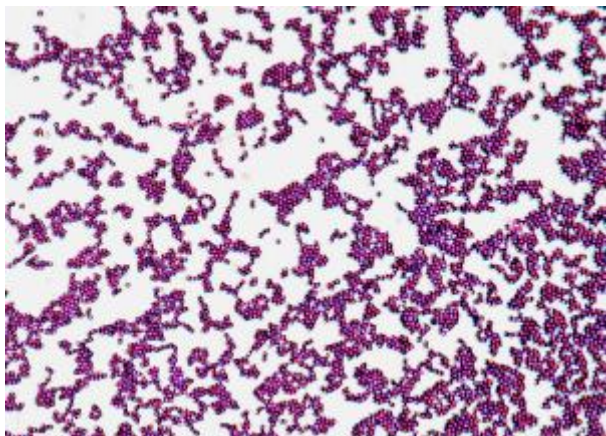
Fot. 4 Hodowla *Staphylococcus epidermidis* na podłożu Chapmana.



Fot. 5 Hodowla *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* na podłożu Chapmana.

Badanie mikroskopowe – barwienie metodą Grama

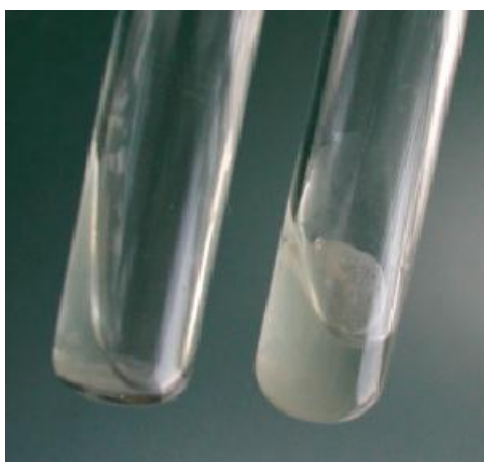
W preparacie barwionym metodą Grama obserwowano Gram - dodatnie ziarenkowce (kuliste komórki o średnicy ok. $1\mu\text{m}$) często ułożone w postaci gron (od grec. *staphyle* = grona).



Fot. 6 Komórki *Staphylococcus aureus* oglądane pod mikroskopem świetlnym.

Test probówkowy na obecność koagulazy.

Szczepy gronkowca powodowały krzepnięcie plazmy, co było widoczne w postaci galaretowatego skrzepu, co świadczy o wytwarzaniu koagulazy.



A

B

Fot. 7 Test probówkowy na obecność koagulazy. W probówce A znajduje się gronkowiec koagulazoujemny. W probówce B znajduje się gronkowiec koagulazododatni, widoczny galaretowaty skrzep króliczego osocza.

Test szkiełkowy na obecność clumping factor.

Szybkie zlepianie się bakterii zachodzące w ciągu 5-15 sek. dowodziło obecności czynnika "clumping factor".

Test krążkowy na nowobiocynę

Zahamowanie wzrostu po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C oznaczało, że szczep był wrażliwy.



Fot.8 Test krążkowy na nowobiocynę (metoda dyfuzyjno-krążkowa). Widoczna strefa zahamowania wzrostu.

Identyfikacja biochemiczna za pomocą testu API STAPH (bio-Mérieux).

1. Po 10 min., odczytano szereg biochemiczny, posługując się tabelą odczytu.

Tab. 14 Tabela odczytu API STAPH

Testy	Substraty	Reakcje/enzymy	Wyniki	
			ujemny	dodatni
0	Brak substratów	Kontrola ujemna	czerwony	-
GLU	D-glukoza	Kontrola dodatnia Zakwaszenie spowodowane wykorzystaniem węglowodanów	czerwony	żółty
FRU	D-fruktoza			
MNE	D-mannoza			
MAL	maltoza			
LAC	laktoza			
TRE	D-trehaloza			
MAN	D-mannitol			
XLT	ksylitol			
MEL	D-melibioza			

Testy	Substraty	Reakcje/ enzymy	Wynik ujemny	Wynik dodatni
NIT	Azotan potasu	Redukcja azotanów do azotynów	NIT1 +NIT 2/ 10 min	
			bezbarwny – jasnoróżowy	czerwony
PAL	Fosforan kwasu β -naftyłowego	Fosfataza zasadowa	ZYM A + ZYM B/ 10 min	
			żółty	fioletowy
VP	Pirogronian sodu		VP1 + VP2/10 min	
			bezbarwny	F ioletowo-różowy
RAF	rafinoza	Zakwaszenie spowodowane wykorzystaniem węglowodanów	czerwony	żółty
XYL	ksyloza			
SAC	sacharoza			
MDG	α -metylo-D-glukozyd			
NAG	N-acetylo-glukozoamina			
<u>ADH</u>	arginina	Dehydrolaza argininy	żółty	pomarańczowo-czerwony
<u>URE</u>	mocznik	Ureaza	żółty	czerwono-fioletowy

- Zapisano wyniki w karcie zapisywania wyników. Testy w karcie podzielono na grupy po trzy testy, a liczby 1, 2 i 4 są przyporządkowane każdemu z nich. Dodając liczby odpowiadające dodatnim reakcjom w zakresie każdej grupy, otrzymuje się 7-cyfrowy numer profilu dla 20 testów na pasku.
- Do identyfikacji gatunku użyto programu komputerowego przez wprowadzenie 7-cyfrowego profilu numerycznego.



Fot. 9 Test biochemiczny API STAPH szczepów nr 8, 9, 18 (SA 98,1%; SA 97,8%; SA 97,8%). Profil numeryczny szczepu nr: (8) 6736151 , (9) (18) 6736153.



Fot. 10 Test biochemiczny API STAPH szczepów nr 36, 42, 70 (SA 97,8%)
Profil numeryczny szczepu nr 36, 42, 70: 6736153.

Oznaczanie oporności badanych szczepów gronkowcowych na metycylinę

Interpretacja wyników

Krażek	Oporność	Średnia wrażliwość	Wrażliwość
Metycylina 5 μ g	≤ 9 mmm	10-13 mm	≥ 14 mm
Oksacylina 5 μ g	≤ 10 mmm	11-12 mm	≥ 13 mm

Tab 15 Wielkości średnic zahamowania wzrostu szczepów gronkowcowych w metodzie dyfuzyjno-krażkowej.

Jakikolwiek wzrost występujący w strefie zahamowania wzrostu świadczył o oporności badanego szczepu na testowany antybiotyk.



Fot. 11 Test krążkowy na metycylinę (metoda dyfuzyjno-krążkowa). Dwa szczepy z widoczną strefą zahamowania wzrostu (szczepy metycylinowrażliwe – MSSA). Dwa szczepy bez widocznej strefy zahamowania wzrostu (szczepy metycylinooporne - MRSA).

Szczegółową charakterystykę wszystkich wyizolowanych szczepów gronkowcowych przedstawiono w tab. 16, 17.

Tab. 16 Szczegółowa charakterystyka szczepów z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych z Oddziału Leczenia Oparzeń: Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS), Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P) i szpitala im. Rydygiera w Krakowie (Rd).

Tab. 17 Szczegółowa charakterystyka szczepów izolowanych od pacjentów z Oddziału Leczenia Oparzeń Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P).

Tab. 16 Szczegółowa charakterystyka szczepów z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych z Oddziału Leczenia Oparzeń: Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS), Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P) i szpitala im. Rydygiera w Krakowie (Rd).

Lp.	Nr szczepu	Nr bad.	Data izolacji	Rodzaj mat.	Inicjały pacjenta	Poch. mat.	Obecność koagulazy	Fermentacja mannitolu	Test API STAPH	Wrażliwość na nowiobiocynę	Oporność na metycylinę	Szczep
1)	1.	6182	13.12.2000	O	S.C.	CLOS	+	+	SA 94,1%	+	+	MRSA
2)	2.	6085	13.12.2000	K	S.C.	CLOS	+	+	SA 94,1%	+	+	MRSA
3)	3.	6196	13.12.2000	R	J.D.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
4)	4.	6035	13.12.2000	K	J.D.	CLOS	+	+	SA 92,8%	+	-	MSSA
5)	5.	5861	13.12.2000	K	M.H.	CLOS	+	+	SA 98,1%	+	+	MRSA
6)	6.	6062	13.12.2000	R	M.H.	CLOS	+	+	SA 98,1%	+	+	MRSA
7)	7.	512	25.01.2001	R	R.K	CLOS	+	+	SA 98,1%	+	+	MRSA
8)	8.	513	25.01.2001	K	R.K	CLOS	+	+	SA 98,1%	+	+	MRSA
9)	9.	530	25.01.2001	K	S.F.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
10)	10.	535	26.01.2001	K	S.F.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
11)	11.	813	07.02.2001	K	S.F.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
12)	12.	2352	13.04.2001	K	H.K.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
13)	13	2353	13.04.2001	K	H.K.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
14)	14.	2407	13.04.2001	R	H.K.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
15)	15.	2413	18.04.2001	K	A.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
16)	16	2508	18.04.2001	R	A.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
17)	17.	2807	08.05.2001	K	T.M.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
18)	18.	2907	11.05.2001	R	T.M.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
19)	19.	3084	20.05.2001	R	P.S.	CLOS	+	+	SA 94,1%	+	+	MRSA
20)	20.	3052	18.05.2001	K	P.S.	CLOS	+	+	SA 94,1%	+	+	MRSA
21)	21.	4951	11.08.2001	R	A.C.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
22)	22.	4894	08.08.2001	K	A.C.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
23)	24.	6086	02.10.2001	K	Z.Z.	CLOS	+	+	SA 94,1%	+	+	MRSA
24)	25.	7624	30.11.2001	R	Z.C.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA

Lp	Nr szczepu	Nr bad.	Data izolacji	Rodz. mat.	Inicjacja pacjenta	Poch. mat.	Obecność koagulazy, clumping factor	Fermentacja mannitolu	Test API STAPH	Wrażliwość na nowiobiocynę	Oporność na metycylinę	Szczep
25)	26.	7625	30.11.2001	K	Z.C.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
26)	27.	7626	30.11.2001	K	Z.C.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
27)	28.	7627	30.11.2001	K	Z.C.	CLOS	+	+	SA 86,7%	+	+	MRSA
28)	29.	–	12.2001	O	J.S.	P	–	–	SE 97,3%	+	+	MRSE
29)	30.	–	12.2001	R	J.S.	P	–	–	SE 97,3%	+	+	MRSE
30)	31.	–	12.2001	R	K.P.	P	–	–	SE 97,3%	+	–	MSSE
31)	32.	–	03.01.2002	R	K.W.	P	–	–	SE 97,3%	+	+	MRSE
32)	33.	–	01.2002	O	M.Z.	P	+	+	SA 94,1%	+	+	MRSA
33)	34.	8320	31.12.2001	K	A.T.	CLOS	+	+	SA 94,1%	+	–	MSSA
34)	35.	8321	31.12.2001	K	A.T.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	–	MSSA
35)	36.	8322	31.12.2001	K	A.T.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	–	MSSA
36)	37.	150	08.01.2002	K	J.P.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
37)	38.	283	11.01.2002	K	E.C.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MSSA
38)	39.	323	14.01.2002	K	R.F.	CLOS	+	+	SA 98,1%	+	–	MSSA
39)	40.	324	14.01.2002	K	R.F.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	–	MSSA
40)	41.	325	14.01.2002	K	R.F.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	–	MSSA
41)	42.	413	17.01.2002	K	L.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
42)	43.	443	18.01.2002	R	L.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
43)	45.	335	08.02.2002	K	W.B.	Rd	–	–	SH 98%	+	–	SH
44)	46.	704	02.2002	R	M.K.	Rd	+	+	SA 86,7%	+	–	MSSA
45)	47.	1238	19.02.2002	R	H.G.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
46)	48.	1240	19.02.2002	K	H.G.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
47)	49.	1241	19.02.2002	K	H.G.	CLOS	+	+	SA 86,7%	+	+	MRSA
48)	50.	821	03.2002	R	K.A.	Rd	+	+	SA 97,8%	+	–	MSSA
49)	51.	1143	03.2002	R	J.L.	Rd	+	+	SA 98,1%	+	–	MSSA
50)	52.	1193	03.2002	R	K.S.	Rd	+	+	SA 97,8%	+	–	MSSA
51)	53.	1945	15.03.2002	K	S.B.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA

Lp	Nr szczepu	Nr bad.	Data izolacji	Rodz. mat.	Inicjacja pacjenta	Poch. mat.	Obecność koagulazy, clumping factor	Fermentacja mannitolu	Test API STAPH	Wrażliwość na nowobiocynę	Oporność na metycylinę	Szczep
52)	54.	1998	18.03.2002	R	S.B.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
53)	55.	2912	19.04.2002	K	S.P.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
54)	56.	2913	19.04.2002	K	S.P.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
55)	57.	2914	19.04.2002	K	S.P.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
56)	58.	2878	18.04.2002	R	Z.B.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
57)	59.	2879	18.04.2002	O	Z.B.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
58)	60.	2750	15.04.2002	K	Z.B.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
59)	61.	2765	15.04.2002	K	L.H.	CLOS	+	+	SA 97,6%	+	+	MRSA
60)	62.	2742	15.04.2002	R	L.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
61)	63.	2962	22.04.2002	K	M.W.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
62)	64.	2952	22.04.2002	R	M.W.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
63)	65.	1542	13.06.2002	R	J.N.	Rd	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
64)	66.	1506	13.06.2002	R	J.S.	Rd	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
65)	67.	2065	13.06.2002	R	E.M.	Rd	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
66)	68.	1252	13.06.2002	R	M.U.	Rd	+	+	SA 97,8%	+	-	MSSA
67)	69.	2393	03.04.2002	K	L.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
68)	70.	2634	10.04.2002	R	L.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
69)	71.	9212	16.12.2002	K	W.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
70)	72.	9213	16.12.2002	K	W.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
71)	73.	9247	18.12.2002	O	W.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
72)	74.	9248	18.12.2002	R	W.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
73)	75.	9340	21.12.2002	R	W.S.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
74)	76.	9389	24.12.2002	K	A.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
75)	77.	9507	31.12.2002	R	A.H.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
76)	78.	9426	27.12.2002	K	M.N.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA
77)	79.	9525	31.12.2002	R	M.N.	CLOS	+	+	SA 97,8%	+	+	MRSA

Tab. 17 Szczegółowa charakterystyka czynników etiologicznych izolowanych od pacjentów z Oddziału Leczenia Oparzeń Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu.

Nr. gr.	Data izolacji	Poch. mat.	In. p.	Podłoże krwawe	Podłoże McConkey	Podłoże Sabourauda	Bulion z solą	Skos z eskuliną	Szczep
29.	12.2001	O	J.S.	Brak hemolizy	—	—	—	—	MRSE
—	12.2001	O	J.S.	—	—	—	+	+	<i>E. faecalis</i>
—	12.2001	O	J.S.	—	+	—	—	—	Pałeczka G (-) laktozo (+)
—	12.2001	K	J.S.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
—	12.2001	R	J.S.	—	—	—	+	+	<i>E. faecalis</i>
30.	12.2001	R	J.S.	Brak hemolizy	—	—	—	—	MRSE
—	12.2001	O	K.P.	—	—	+	—	—	Grzyby drożdżopod.
—	12.2001	O	K.P.	—	—	—	+	+	<i>E. faecalis</i>
—	12.2001	O	K.P.	—	+	—	—	—	Pałeczka laktozo (+)
—	12.2001	K	K.P.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
31.	12.2001	R	K.P.	Brak hemolizy	—	—	—	—	MSSE
—	31.12.2001	R	F.L.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
—	31.12.2001	K	F.L.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
—	31.12.2001	O	F.L.	—	+	—	—	—	Pałeczka G (-) laktozo (+)
32.	03.01.2002	R	K.W.	Brak hemolizy	—	—	—	—	MRSE
—	31.12.2001	R	K.W.	—	—	—	+	+	<i>E. faecalis</i>
—	31.12.2001	O	K.W.	—	+	—	—	—	Pałeczka G (-) laktozo (+)
—	03.01.2002	O	K.W.	—	—	—	+	+	<i>E. faecalis</i>
—	03.01.2002	K	K.W.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
—	01.2002	R	P.Z.	—	—	—	+	+	<i>E. faecalis</i>
—	01.2002	O	P.Z.	—	+	—	—	—	Pałeczka G (-) laktozo (+)
—	01.2002	K	P.Z.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
—	01.2002	R	M.Z.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
33.	01.2002	O	M.Z.	Hemoliza typu β	—	—	—	—	MRSA
—	01.2002	K	M.Z.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny
—	01.2002	R	J.Ć.	—	Wzrost bez rozkładu laktozy	—	—	—	Pałeczka G (-) laktozo (-)
—	01.2002	O	J.Ć.	—	+	—	—	—	Pałeczka G (-) laktozo (+)
—	01.2002	K	J.Ć.	—	—	—	—	—	Wynik ujemny

Szczegółowa charakterystyka szczepów gronkowcowych nr: 29, 30, 31, 32, 33 znajduje się w tab. 16.

Wrażliwość badanych szczepów na antybiotyki.

Wyniki wrażliwości 47 szczepów MRSA i 16 szczepów MSSA przedstawiono w tab.18

Tab. 18 Antybiotykooporność szczepów gronkowcowych wrażliwych i opornych na metycylinę z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS).

Nr i nazwa	Nr bad.	Data	Rodz. mat.	Inicjały pacjenta	OX	E	DA	SXT	CIP	GE	VA	TEC	MUP	RA	FD
1. MRSA	6182	13.12.2000	O	S.C.	o	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2. MRSA	6085	13.12.2000	K	S.C.	o	o	o	o	o	w	w	w	w	w	w
3. MSSA	6196	13.12.2000	R	J.D.	w	o	o	w	o	o	w	w	w	w	w
4. MSSA	6035	13.12.2000	K	J.D.	w	w	w	w	w	–	w	w	w	w	w
5. MRSA	5861	13.12.2000	K	M.H.	o	w	w	–	w	o	w	w	w	w	w
6. MRSA	6062	13.12.2000	R	M.H.	o	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7. MRSA	512	25.01.2001	R	R.K	o	w	w	w	o	o	w	w	w	–	w
8. MRSA	513	25.01.2001	K	R.K	o	o	o	o	o	o	w	w	–	w	w
9. MRSA	530	25.01.2001	K	S.F.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	w
10. MRSA	535	26.01.2001	K	S.F.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	w
11. MRSA	813	07.02.2001	K	S.F.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	w
12. MRSA	2352	13.04.2001	K	H.K.	o	o	o	–	–	w	w	w	–	w	w

Nr i nazwa	Nr bad.	Data	Rodz. mat.	Inicjaly pacjenta	OX	E	DA	SXT	CIP	GE	VA	TEC	MUP	RA	FD
13. MSSA	2353	13.04.2001	K	H.K.	w	w	w	–	w	w	w	w	–	w	w
14. MRSA	2407	13.04.2001	R	H.K.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	w	w
15. MSSA	2413	18.04.2001	K	A.S.	w	o	o	w	o	o	w	w	–	w	w
16. MSSA	2508	18.04.2001	R	A.S.	w	o	o	w	o	o	w	w	–	w	w
17. MRSA	2807	08.05.2001	K	T.M.	o	w	w	o	w	o	w	w	–	w	–
18. MRSA	2907	11.05.2001	R	T.M.	o	o	o	o	o	o	w	w	o	w	w
19. MRSA	3084	20.05.2001	R	P.S.	o	o	o	–	o	o	w	w	w	w	o
20. MRSA	3052	18.05.2001	K	P.S.	o	o	o	–	o	w	w	w	–	w	w
21. MSSA	4951	11.08.2001	R	A.C.	w	w	w	w	–	w	w	w	w	–	–
22. MRSA	4894	08.08.2001	K	A.C.	o	o	o	–	o	o	w	w	–	–	w
24. MRSA	6086	02.10.2001	K	Z.Z.	o	o	o	o	w	w	w	w	–	w	o
25. MRSA	7624	30.11.2001	R	Z.C.	o	o	o	w	o	o	w	w	w	–	–
26. MRSA	7625	30.11.2001	K	Z.C.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
27. MRSA	7626	30.11.2001	K	Z.C.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
28. MRSA	7627	30.11.2001	K	Z.C.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
34. MSSA	8320	31.12.2001	K	A.T.	w	–	–	w	w	w	–	–	–	–	–

Nr i nazwa	Nr bad.	Data	Rodz. mat.	Inicjaly pacjenta	OX	E	DA	SXT	CIP	GE	VA	TEC	MUP	RA	FD
35. MSSA	8321	31.12.2001	K	A.T.	w	–	–	w	w	w	–	–	–	–	–
36. MSSA	8322	31.12.2001	K	A.T.	w	–	–	w	w	w	–	–	–	–	–
37. MRSA	150	08.01.2002	K	J.P.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
38. MSSA	283	11.01.2002	K	E.C.	w	w	w	w	sw	w	–	–	–	–	–
39. MSSA	323	14.01.2002	K	R.F.	w	w	w	w	w	w	–	–	–	–	–
40. MSSA	324	14.01.2002	K	R.F.	w	w	w	w	w	w	–	–	–	–	–
41. MSSA	325	14.01.2002	K	R.F.	w	w	w	w	w	w	–	–	–	–	–
42. MRSA	413	17.01.2002	K	L.H.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
43. MRSA	443	18.01.2002	R	L.H.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	–
47. MRSA	1238	19.02.2002	R	H.G.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	–
48. MRSA	1240	19.02.2002	K	H.G.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
49. MRSA	1241	19.02.2002	K	H.G.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
53. MRSA	1945	15.03.2002	K	S.B.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	–
54. MRSA	1998	18.03.2002	R	S.B.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	–
55. MSSA	2912	19.04.2002	K	S.P.	w	w	w	w	w	w	–	–	–	–	–
56. MSSA	2913	19.04.2002	K	S.P.	w	w	w	w	w	w	–	–	–	–	–

Nr i nazwa	Nr bad.	Data	Rodz. mat.	Inicjaly pacjenta	OX	E	DA	SXT	CIP	GE	VA	TEC	MUP	RA	FD
57. MSSA	2914	19.04.2002	K	S.P.	w	w	w	w	w	w	–	–	–	–	–
58. MRSA	2878	18.04.2002	R	Z.B.	o	w	w	o	o	o	w	w	–	–	–
59. MRSA	2879	18.04.2002	O	Z.B.	o	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
60. MRSA	2750	15.04.2002	K	Z.B.	o	w	w	w	o	o	w	w	–	–	–
61. MRSA	2765	15.04.2002	K	L.H.	o	o	o	o	sw	o	w	w	–	–	–
62. MRSA	2742	15.04.2002	R	L.H.	o	o	o	w	w	o	w	w	–	–	–
63. MRSA	2962	22.04.2002	K	M.W.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
64. MRSA	2952	22.04.2002	R	M.W.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	–
69. MRSA	2393	03.04.2002	K	L.H.	o	o	o	w	sw	o	w	w	–	–	–
70. MRSA	2634	10.04.2002	R	L.H.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
71. MRSA	9212	16.12.2002	K	W.S.	o	o	o	sw	o	o	w	w	–	–	–
72. MRSA	9213	16.12.2002	K	W.S.	o	o	o	sw	o	o	w	w	–	–	–
73. MRSA	9247	18.12.2002	O	W.S.	o	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
74. MRSA	9248	18.12.2002	R	W.S.	o	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
75. MRSA	9340	21.12.2002	R	W.S.	o	o	o	w	o	o	w	w	–	–	–
76. MRSA	9389	24.12.2002	K	A.H.	o	w	w	o	o	o	w	w	–	–	–

Nr i nazwa	Nr bad.	Data	Rodz. mat.	Inicjały pacjenta	OX	E	DA	SXT	CIP	GE	VA	TEC	MUP	RA	FD
77. MRSA	9507	31.12.2002	R	A.H.	o	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
78. MRSA	9426	27.12.2002	K	M.N.	o	o	o	sw	o	o	w	w	–	–	–
79. MRSA	9525	31.12.2002	R	M.N.	o	o	o	o	o	o	w	w	–	–	–

Stosowane skróty:

OX – oksacylina
 E – erytromycyna
 DA – klindamycyna
 SXT – kotrimoksazol
 CIP – ciprofloksacyna
 GE – gentamycyna
 VA – wankomycyna
 TEC – teikoplanina
 MUP – mupirocyna
 RA – ryfampicyna
 FD – kwas fusydynowy

Dobór chemioterapeutyków zastosowanych w lekooporności jest standardowy dla szczepów MRSA ze względu na ich dominację w kolekcji.

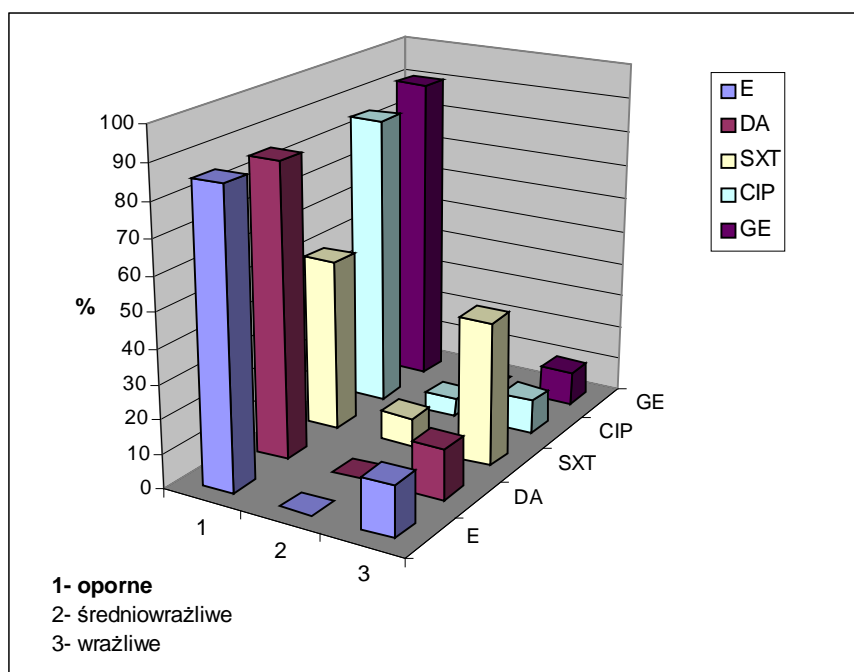
Wrażliwość na antybiotyki c.d.

Wśród analizowanych 41 szczepów MRSA nie było ani jednego szczepu wrażliwego na wszystkie badane antybiotyki

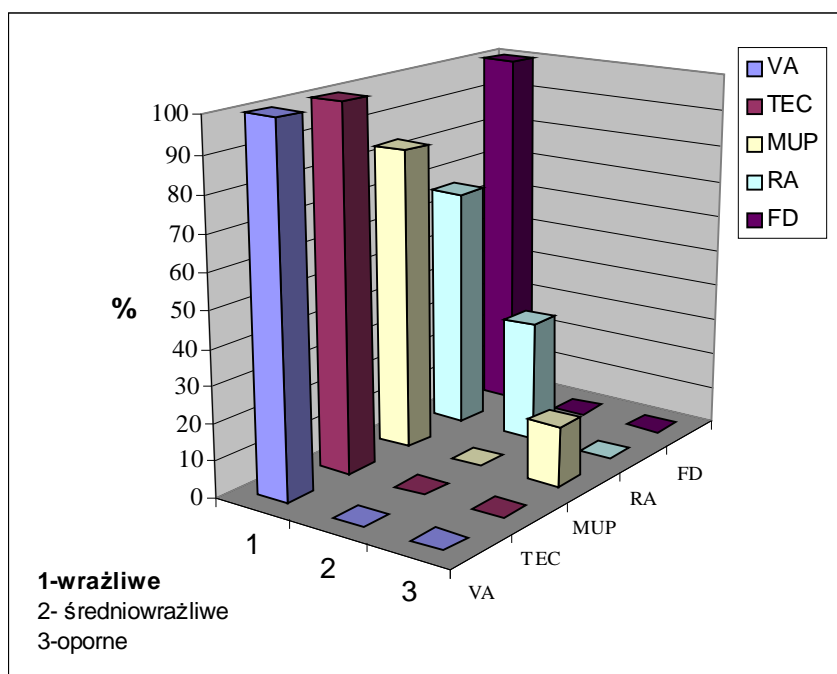
i chemioterapeutyki. Wszystkie szczepy MRSA były wrażliwe na teikoplaninę (TEC) i wankomycynę (VA) oraz ryfampicynę (RA). Większość szczepów należała do szczepów wieloopornych i wykazywała oporność na: gentamycynę (GE) – 90,24%, erytromycynę (E) – 85,36%, klindamycynę (DA) – 85,36%, ciprofloksacyna (CIP) – 85% (całkowita liczba szczepów n =40), kotrimoksazol (SXT) – 50% (n=36), mupirocynę (MUP) – 16,6% (n=6) oraz kwas fusydynowy (FD) – 14,28% (n=14).

Wśród analizowanych 15 szczepów MSSA większość szczepów była wrażliwa na wszystkie antybiotyki i chemioterapeutyki (VA, TEC, MUP, RA, FD). Tylko 3 szczepy były odporne na następujące antybiotyki: erytromycynę (n=13) , klindamycynę – 23% (n=13) oraz na ciprofloksacynę i gentamycynę – 20%.

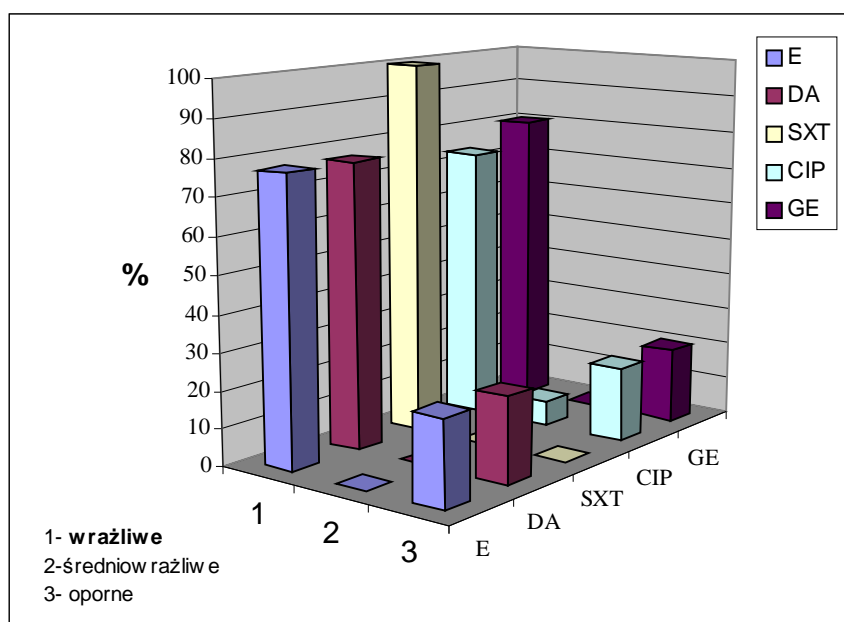
Wyniki wrażliwości szczepów MRSA przedstawiono na ryc. 6, 7, 8.



Ryc. 6. Oporność szczepów MRSA na wybrane antybiotyki.



Ryc. 7. Wrażliwość szczepów MRSA na wybrane antybiotyki.



Ryc. 8. Oporność szczepów MSSA na wybrane antybiotyki.

Wzory oporności

Wśród 41 szczepów MRSA wyodrębniono 14 wzorów oporności. Najczęściej występującymi wzorami były:

∅ EDaCipGe	14 szczepów	34,15%
∅ EDaSxtCipGe	11 szczepów	26,83%
∅ CipGe	2 szczepy	4,88%
∅ SxtCipGe	2 szczepy	4,88%
∅ EDaGe	2 szczepy	4,88%
∅ EDaSxtGe	2 szczepy	4,88%

Tab. 19. Wzory oporności szczepów MRSA na antybiotyki.

Nr wzoru	Wzór	Całkowita liczba szczepów n=41	(%)
1.	EDaCipGe	14	34,15
2.	EDaSxtCipGe	11	26,83
3.	CipGe	2	4,88
4.	SxtCipGe	2	4,88
5.	EDaGe	2	4,88
6.	EDaSxtGe	2	4,88
7.	EDaSxtCip	1	2,44
8.	Ge	1	2,44
9.	EDa	1	2,44
10.	SxtGe	1	2,44
11.	EDaCipGeFd	1	2,44
12.	EdaSxtCipGeMup	1	2,44
13.	EDaCip	1	2,44
14.	EDaSxtFd	1	2,44

Wśród 15 szczepów MSSA wyodrębniono tylko 1 wzór oporności: EdaCipGe (18,75%).

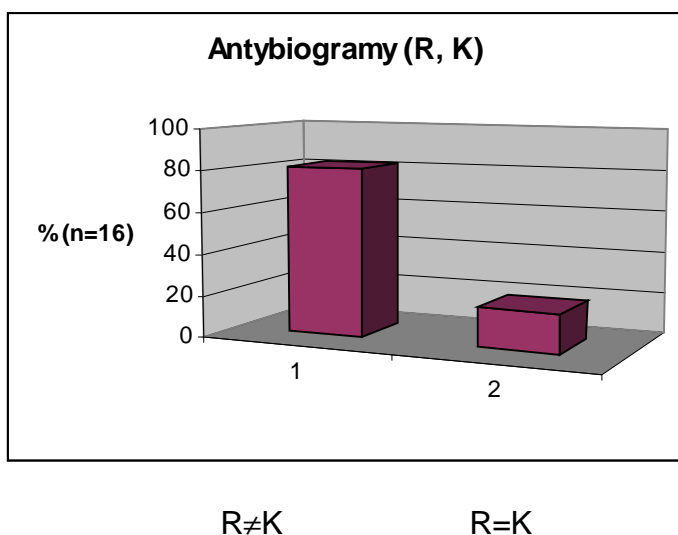
Antybiogramy szczepów wyizolowanych z rany i krwi (R-K).

Ze względu na analizę fenotypową szczepów wyizolowanych z rany i krwi porównano ich antybiogramy.

Antybiogramy (R-K)	
Różne (R≠K)	Identyczne (R=K)
Inicjały pacjentów	
1. J.D. (3,4)	1. A.S. (15,16)
2. R.K. (7,8)	2. Z.C. (25,26)
3. H.K. (13,14)	3. S.B. (53,54)
4. T.M (17,18)	
5. P.S. (19,20)	
6. A.C. (21,22)	
7. L.H. (42,43)	
8. H.G. (47,48)	
9. Z.B. (58,60)	
10.L.H. (2×) (61,62) (69,70)	
11.M.W. (63,64)	
12.M.N. (78,79)	

Tab. 20 Antybiogramy szczepów wyizolowanych z rany i krwi (R-K).

Antybiogramy szczepów wyizolowanych z rany i krwi (R-K) były różne u 12 pacjentów (13 antybiogramów R≠K – 81,25%) oraz identyczne tylko u 3 pacjentów (R=K 18,75%).



Ryc. 9 Antybiogramy szczepów wyizolowanych z rany i krwi

Wyniki tej analizy są podstawą do dalszych badań translokacji bakteryjnej gronkowców i znalezienia źródła zakażenia uogólnionego.

W dalszym etapie pracy przeprowadzono analizę genotypową w/w szczepów, która w założeniu ma potwierdzić zaobserwowane różnice.

4.3 Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA

Badano pokrewieństwo genetyczne między szczepami rodzaju *Staphylococcus* izolowanymi z krwi, rany i odczynu od jednego chorego. W tym celu wykonano typowanie genetyczne wybranych szczepów.

Wzory restrykcyjne RFLP, uzyskane za pomocą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), po trawieniu chromosomalnego DNA enzymem *Sma*I przedstawiono w tabeli 21 i udokumentowano fotografiami: 12-30.

Typy RFLP oznaczono, odpowiednio literą alfabetu, podtypy literą z indeksem liczbowym.

Tab. 21 Wzory restrykcyjne PFGE badanych szczepów.
Zaznaczono szczepy od tego samego pacjenta o identycznym typie genetycznym.

Nr szczepu	Nr badania	Data izolacji	Rodzaj materiału	Inicjały pacjenta	Szczep	Poch. Materiału	Wzór PFGE
1.	6182	13.12.2000	O	S.C.	MRSA	CLOS	A
2.	6085	13.12.2000	K	S.C.	MRSA	CLOS	A
3.	6196	13.12.2000	R	J.D.	MSSA	CLOS	A ₂
4.	6035	13.12.2000	K	J.D.	MSSA	CLOS	B
5.	5861	13.12.2000	K	M.H.	MRSA	CLOS	C
6.	6062	13.12.2000	R	M.H.	MRSA	CLOS	C
7.	512	25.01.2001	R	R.K	MRSA	CLOS	K ₂
8.	513	25.01.2001	K	R.K	MRSA	CLOS	K
9.	530	25.01.2001	K	S.F.	MRSA	CLOS	g ₂
10.	535	26.01.2001	K	S.F.	MRSA	CLOS	NB
11.	813	07.02.2001	K	S.F.	MRSA	CLOS	NB
12.	2352	13.04.2001	K	H.K.	MRSA	CLOS	H
13	2353	13.04.2001	K	H.K.	MSSA	CLOS	NB
14.	2407	13.04.2001	R	H.K.	MRSA	CLOS	H
15.	2413	18.04.2001	K	A.S.	MSSA	CLOS	b
16	2508	18.04.2001	R	A.S.	MSSA	CLOS	c
17.	2807	08.05.2001	K	T.M.	MRSA	CLOS	D
18.	2907	11.05.2001	R	T.M.	MRSA	CLOS	E
19.	3084	20.05.2001	R	P.S.	MRSA	CLOS	F
20.	3052	18.05.2001	K	P.S.	MRSA	CLOS	F
21.	4951	11.08.2001	R	A.C.	MSSA	CLOS	G
22.	4894	08.08.2001	K	A.C.	MRSA	CLOS	F
24.	6086	02.10.2001	K	Z.Z.	MRSA	CLOS	–
25.	7624	30.11.2001	R	Z.C.	MRSA	CLOS	F₁
26.	7625	30.11.2001	K	Z.C.	MRSA	CLOS	F₁

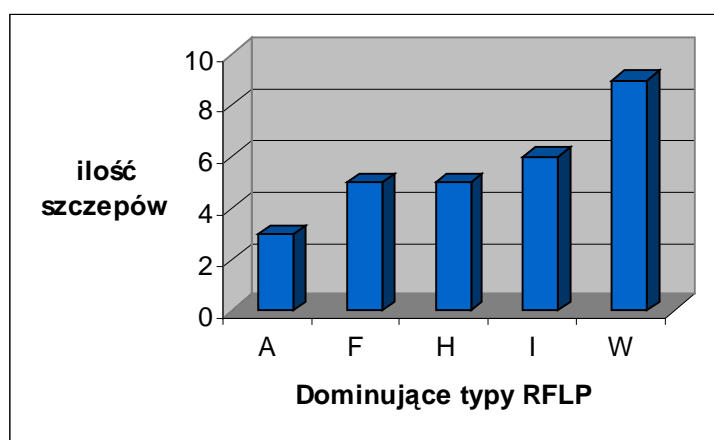
Nr szczepu	Nr badania	Data izolacji	Rodzaj materiału	Inicjały pacjenta	Szczep	Poch. Materiału	Wzór PFGE
27.	7626	30.11.2001	K	Z.C.	MRSA	CLOS	NB
28.	7627	30.11.2001	K	Z.C.	MRSA	CLOS	NB
29.	–	12.2001	O	J.S.	MRSE	P	L
30.	–	12.2001	R	J.S.	MRSE	P	M
31.	–	12.2001	R	K.P.	SE	P	d
32.	–	03.01.2002	R	K.W.	MRSE	P	e
33.	–	01.2002	O	M.Z.	MRSA	P	f
34.	8320	31.12.2001	K	A.T.	MSSA	CLOS	X
35.	8321	31.12.2001	K	A.T.	MSSA	CLOS	I ₁
36.	8322	31.12.2001	K	A.T.	MSSA	CLOS	X ₁
37.	150	08.01.2002	K	J.P.	MRSA	CLOS	I ₁
38.	283	11.01.2002	K	E.C.	MSSA	CLOS	I ₂
39.	323	14.01.2002	K	R.F.	MSSA	CLOS	I
40.	324	14.01.2002	K	R.F.	MSSA	CLOS	I
41.	325	14.01.2002	K	R.F.	MSSA	CLOS	I
42.	413	17.01.2002	K	L.H.	MRSA	CLOS	Y
43.	443	18.01.2002	R	L.H.	MRSA	CLOS	Y ₂
45.	335	08.02.2002	K	W.B.	SH	Rd	Y ₂
46.	704	02.2002	R	M.K.	MSSA	Rd	J
47.	1238	19.02.2002	R	H.G.	MRSA	CLOS	H₂
48.	1240	19.02.2002	K	H.G.	MRSA	CLOS	H₂
49.	1241	19.02.2002	K	H.G.	MRSA	CLOS	H ₂
50.	821	03.2002	R	K.A.	MSSA	Rd	N
51.	1143	03.2002	R	J.L.	MSSA	Rd	Z
52.	1193	03.2002	R	K.S.	MSSA	Rd	P
53.	1945	15.03.2002	K	S.B.	MRSA	CLOS	R
54.	1998	18.03.2002	R	S.B.	MRSA	CLOS	R
55.	2912	19.04.2002	K	S.P.	MSSA	CLOS	R ₂
56.	2913	19.04.2002	K	S.P.	MSSA	CLOS	NB
57.	2914	19.04.2002	K	S.P.	MSSA	CLOS	NB
58.	2878	18.04.2002	R	Z.B.	MRSA	CLOS	O
59.	2879	18.04.2002	O	Z.B.	MRSA	CLOS	O
60.	2750	15.04.2002	K	Z.B.	MRSA	CLOS	O
61.	2765	15.04.2002	K	L.H.	MRSA	CLOS	T
62.	2742	15.04.2002	R	L.H.	MRSA	CLOS	S
63.	2962	22.04.2002	K	M.W.	MRSA	CLOS	S ₁
64.	2952	22.04.2002	R	M.W.	MRSA	CLOS	U
65.	1542	13.06.2002	R	J.N.	MSSA	Rd	A
66.	1506	13.06.2002	R	J.S.	MSSA	Rd	i
67.	2065	13.06.2002	R	E.M.	MSSA	Rd	J
68.	1252	13.06.2002	R	M.U.	MSSA	Rd	j ₁
69.	2393	03.04.2002	K	L.H.	MRSA	CLOS	G
70.	2634	10.04.2002	R	L.H.	MRSA	CLOS	G ₁
71.	9212	16.12.2002	K	W.S.	MRSA	CLOS	W ₂
72.	9213	16.12.2002	K	W.S.	MRSA	CLOS	W
73.	9247	18.12.2002	O	W.S.	MRSA	CLOS	W ₁

Nr szczepu	Nr badania	Data izolacji	Rodzaj materiału	Inicjały pacjenta	Szczep	Poch. Materiału	Wzór PFGE
74.	9248	18.12.2002	R	W.S.	MRSA	CLOS	W
75.	9340	21.12.2002	R	W.S.	MRSA	CLOS	W
76.	9389	24.12.2002	K	A.H.	MRSA	CLOS	W
77.	9507	31.12.2002	R	A.H.	MRSA	CLOS	W
78.	9426	27.12.2002	K	M.N.	MRSA	CLOS	W
79.	9525	31.12.2002	R	M.N.	MRSA	CLOS	W

W całej badanej kolekcji stwierdzono dużą różnorodność wzorów RFLP.

Wyodrębniono 34 typy RFLP oraz ich podtypy – blisko i potencjalnie spokrewnione.

Dominującymi typami RFLP był typ: **W** (71 W₂, 72 W, 73 W₁, 74 W, 75W, 76 W, 77 W, 78 W, 79 W), **I** (39 I, 40I, 41I, 35 I₁, 37 I₁, 38 I₂), **H** (12H, 14H, 47H₂, 48H₂, 49H₂), **F** (19F, 20F, 22F, 25F₁, 26 F₁), **A** (1A,2A,3A₂).



Ryc. 10 Dominujące typy RFLP.

Szczepy nierozróżnialne genotypowo stwierdzono u trzech różnych pacjentów, hospitalizowanych w tym samym czasie: W.S. (72K, 74 (75) R); A.H. (76K, 77R); M.N. (78K, 79R), co pozwala przypuszczać o rozprzestrzenianiu się zakażenia i transmisji szczepów na oddziale.

Tab. 22 Wzory oporności głównych typów genetycznych.

Typ i podtyp genetyczny	Nr szczepu	Miejsce izolacji	Inicjały pacjenta	Wzór oporności
A	1	O	S.C.	NB
A	2	K	S.C.	EDaSxtCip
A ₂	3	R	J.D.	EDaCipGe
F	19	R	P.S.	EDaCipGeFd
F	20	K	P.S.	EDaCip
F	22	K	A.C.	EDaCipGe
F ₁	25	R	Z.C.	EDaCipGe
F ₁	26	K	Z.C.	EDaCipGe
H	12	K	H.K.	EDa
H	14	R	H.K.	EDaSxtCipGe
H ₂	47	R	H.G.	EDaSxtCipGe
H ₂	48	K	H.G.	EDaCipGe
H ₂	49	K	H.G.	EDaCipGe
I	39	K	R.F.	wrażliwy
I	40	K	R.F.	wrażliwy
I	41	K	R.F.	wrażliwy
I ₁	35	K	A.T.	wrażliwy
I ₁	37	K	J.P.	EDaCipGe
I ₂	38	K	F.C.	wrażliwy i św na Cip
W	72	K	W.S.	EDaCipGe
W	74	R	W.S.	NB
W	75	R	W.S.	EDaCipGe
W	76	K	A.H.	SxtCipGe
W	77	R	A.H.	NB
W	78	K	M.N.	EDaCipGe
W	79	R	M.N.	EDaSxtCipGe
W ₁	73	O	W.S.	NB
W ₂	71	K	W.S.	EDaCipGe

Typy genetyczne: A, F, H i W charakteryzują się większą opornością na antybiotyki niż typ I, który był wrażliwy na wszystkie lub większość zastosowanych antybiotyków (z wyjątkiem szczepu nr 37).

Wśród typów RFLP F, H i W dominującym wzorem oporności był wzór: EDaCipGe czyli szczepy w większości przypadków były odporne na erytromycynę (E), klindamycynę (DA), ciprofloksacynę (CIP) i gentamycynę (GE). Ponadto typ A, H i W był odporny na kotrimoksazol (SXT) oraz typ F na kwas fusydynowy (FD).

Tab. 23 Podział szczepów gronkowcowych wyizolowanych z krwi, rany, odbytu od jednego pacjenta o różnym i tym samym profilu genetycznym.

Miejsce izolacji	R-K-O	R-K	K-O	R-O
Profil genet. – różny	74 (W) – 72 (W) – 73 (W ₁) 75 (W) – 71 (W ₂) – 73 (W ₁)	3 (A ₂) – 4 (B) 7 (K ₂) – 8 (K) 16 (c) – 15 (b) 18 (E) – 17 (D) 21 (G) – 22 (F) 43 (Y ₂) – 42 (Y) 62 (S) – 61 (T) 64 (U) – 63 (S ₁) 70 (g ₁) – 69 (g)		30 (M) – 29 (L)
Profil genet. – identyczny	58 (O) – 60 (O) – 59 (O)	6 (C) – 5 (C) 14 (H) – 12 (H) 19 (F) – 20 (F) 47 (H ₂) – 48 (H ₂) 54 (R) – 53 (R) 77 (W) – 76 (W) 79 (W) – 78 (W)	2 (A) – 1 (A)	

Szczepy wyizolowane z rany, krwi i odbytu posiadały identyczny wzór restrykcyjny RFLP u jednego pacjenta (Z.B.), natomiast u drugiego pacjenta (W.S.) był różny, z wyjątkiem szczepów wyizolowanych z krwi (nr 72) i rany (nr 74). Szczepy pacjenta W.S. były ze sobą blisko spokrewnione (W_1) lub potencjalnie spokrewnione (W_2). Szczepy wyizolowane z rany i krwi o tym samym typie genetycznym zaobserwowano u 8 pacjentów, natomiast u 9 pacjentów typy genetyczne były różne (tab. 23), w tym było 12 szczepów niespokrewnionych (3-4, 16-15, 18-17, 21-22, 62-61, 64-63) u 6 pacjentów, 4 szczepy potencjalnie spokrewnione (7-8, 43-42) u 2 pacjentów i 2 szczepy blisko spokrewnione u jednego pacjenta (70-69).

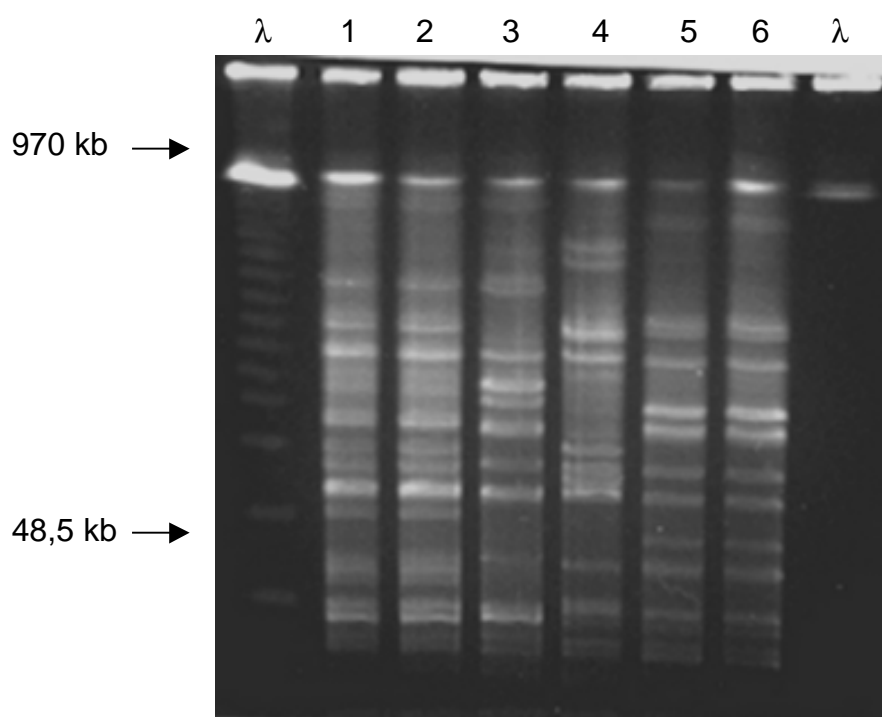
Identyczny profil genetyczny szczepów wyizolowanych z krwi i odbytu (2-1) wystąpił u jednego pacjenta.

Różny wzór restrykcyjny RFLP szczepów wyizolowanych rany i odbytu (30-29) wystąpił również tylko u jednego pacjenta.

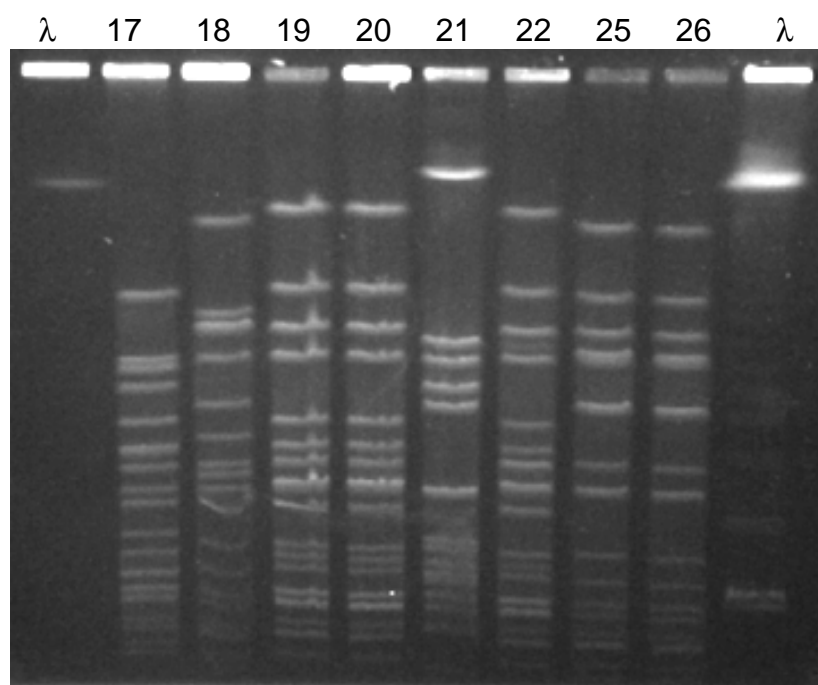
Stwierdzono występowanie szczepów niespokrewnionych z krwi i rany u jednego pacjenta, a także wykazano podobieństwo genotypowe szczepów pochodzących z krwi i jelit.

Powyższe obserwacje stanowiły podstawę do dalszych badań translokacji bakteryjnej gronkowców.

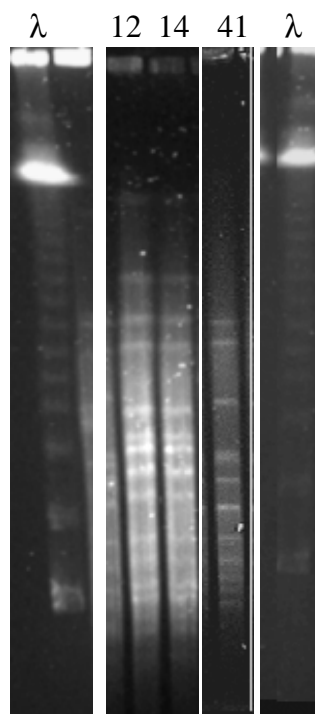
Rozdział w żelu agarozowym (PFGE) szczepów wymienionych w tab. 21 jest przedstawiony na fotografiach (Fot. 12-30).



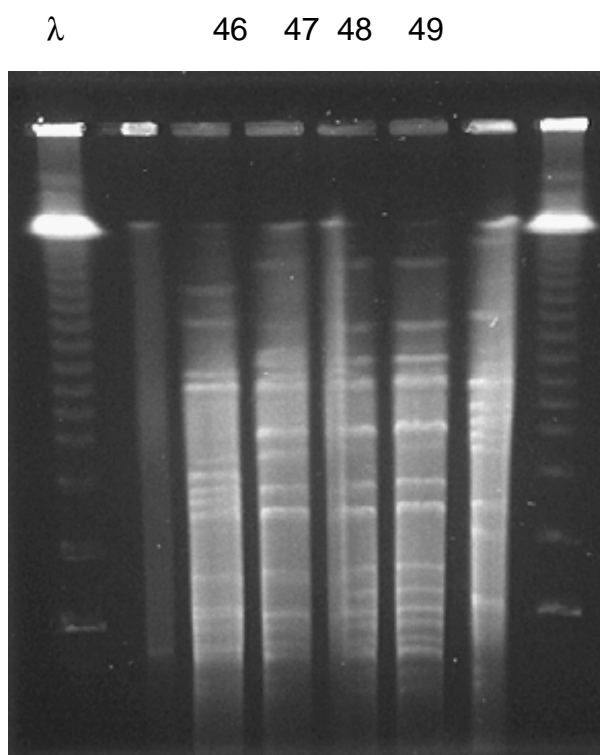
Fot. 12 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA izolatów gronkowcowych z krwi, z ran i odbytu (1O, 2K, 3R, 4K, 5K, , 6R) pacjentów z Centrum Leczenia Oparzeń (CLOS).



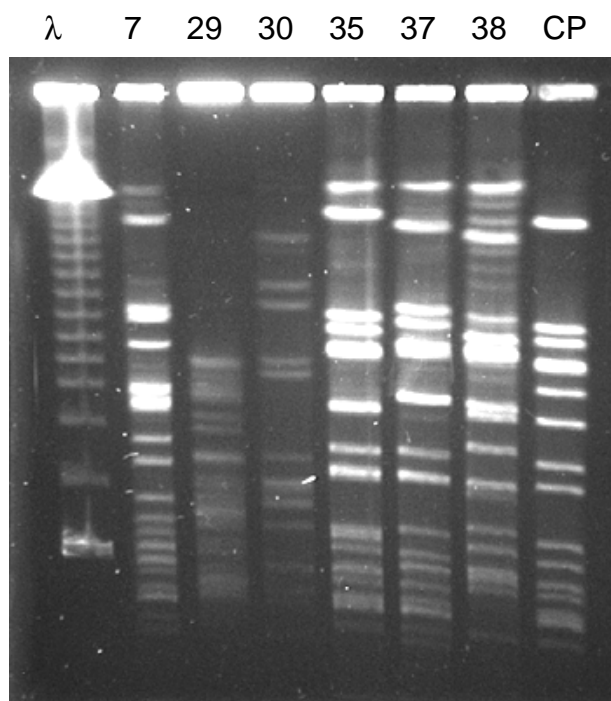
Fot. 13 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA izolatów gronkowcowych z krwi, z ran (17K,18R,19R, 20K, 21R, 22K, 25R, 26K) pacjentów z CLOS.



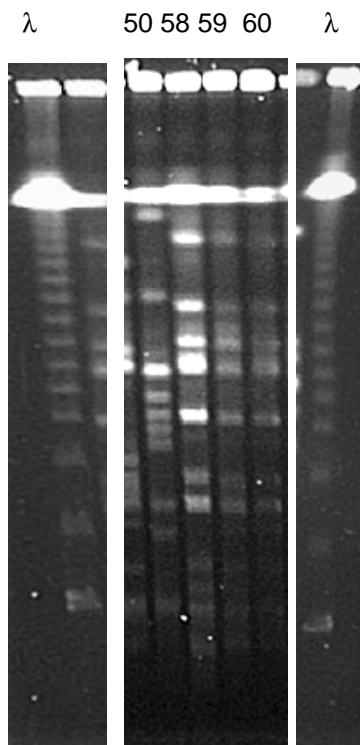
Fot. 14 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i ran (12K, 14R, 41K) pacjentów z CLOS.



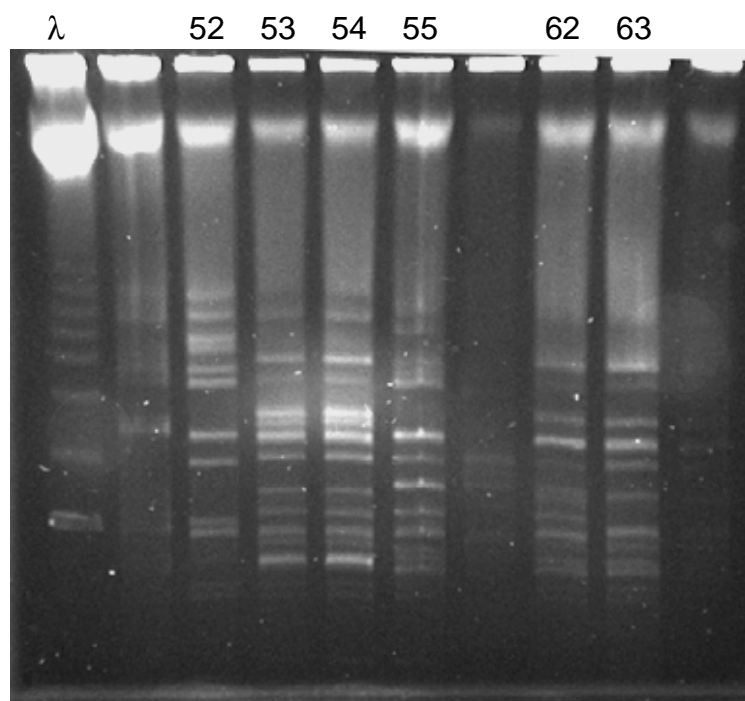
Fot. 15 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i ran pacjentów z CLOS (47R, 48K, 49K) i rany pacjenta z OLO (Rd) (46R).



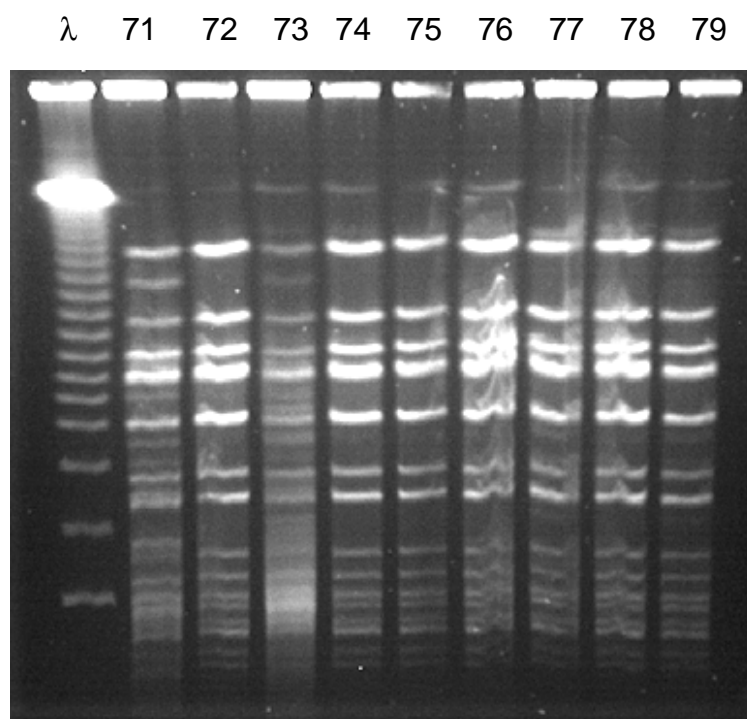
Fot. 16 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (7R, 35K, 37K, 38K) oraz z rany i odbytu pacjenta z OLO (P) (29O, 30R).



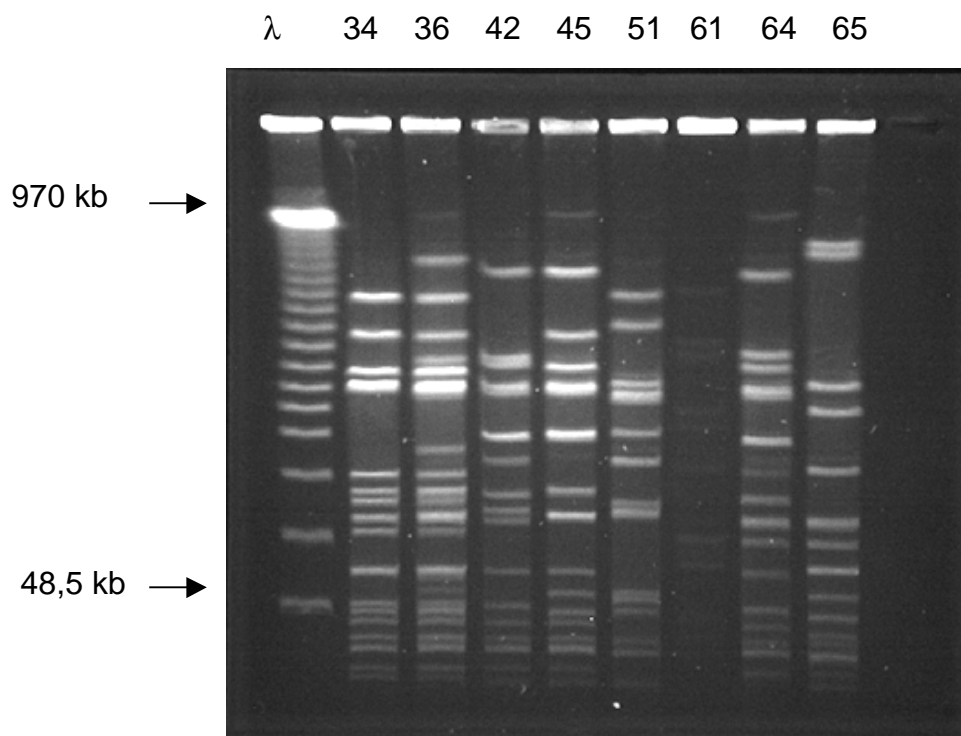
Fot. 17 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (58R, 59O, 60K) oraz z rany (Rd) (50R).



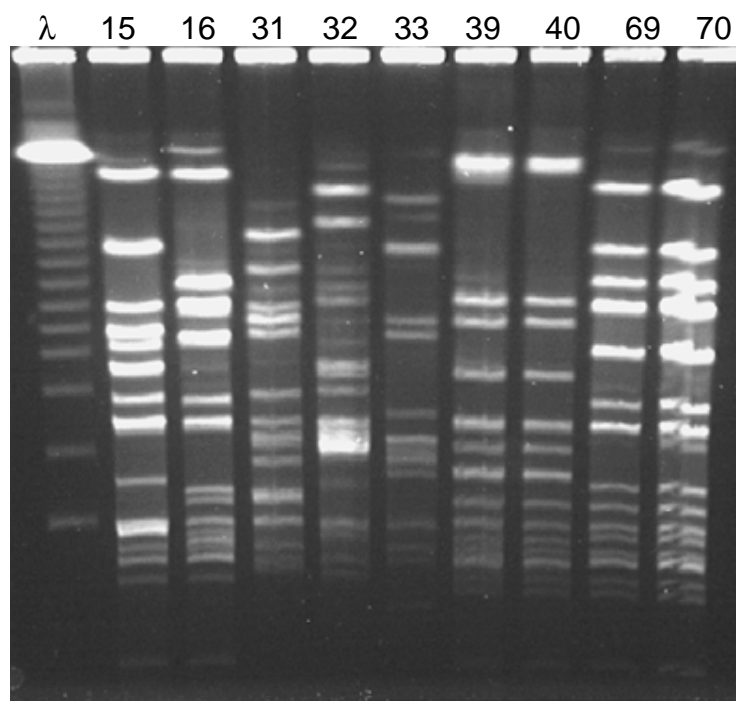
Fot. 18 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (53K, 54R, 55K, 62R, 63K) oraz z rany pacjenta (Rd) (52R).



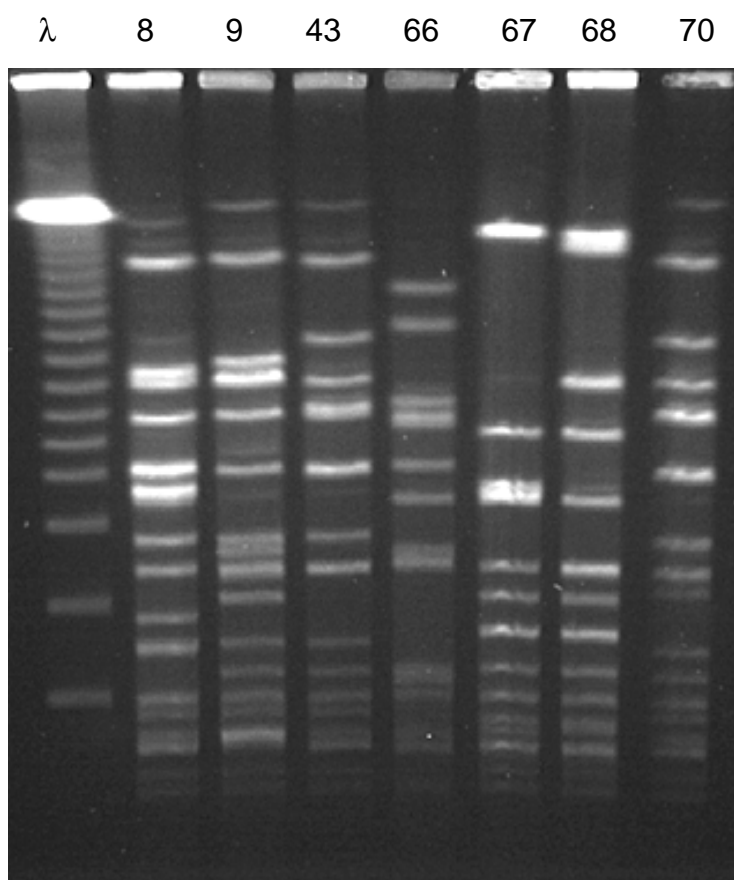
Fot. 19 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi rany i odbytu pacjentów z CLOS (71K, 72K, 73O, 74R, 75R, 76K, 77R, 78K, 79R).



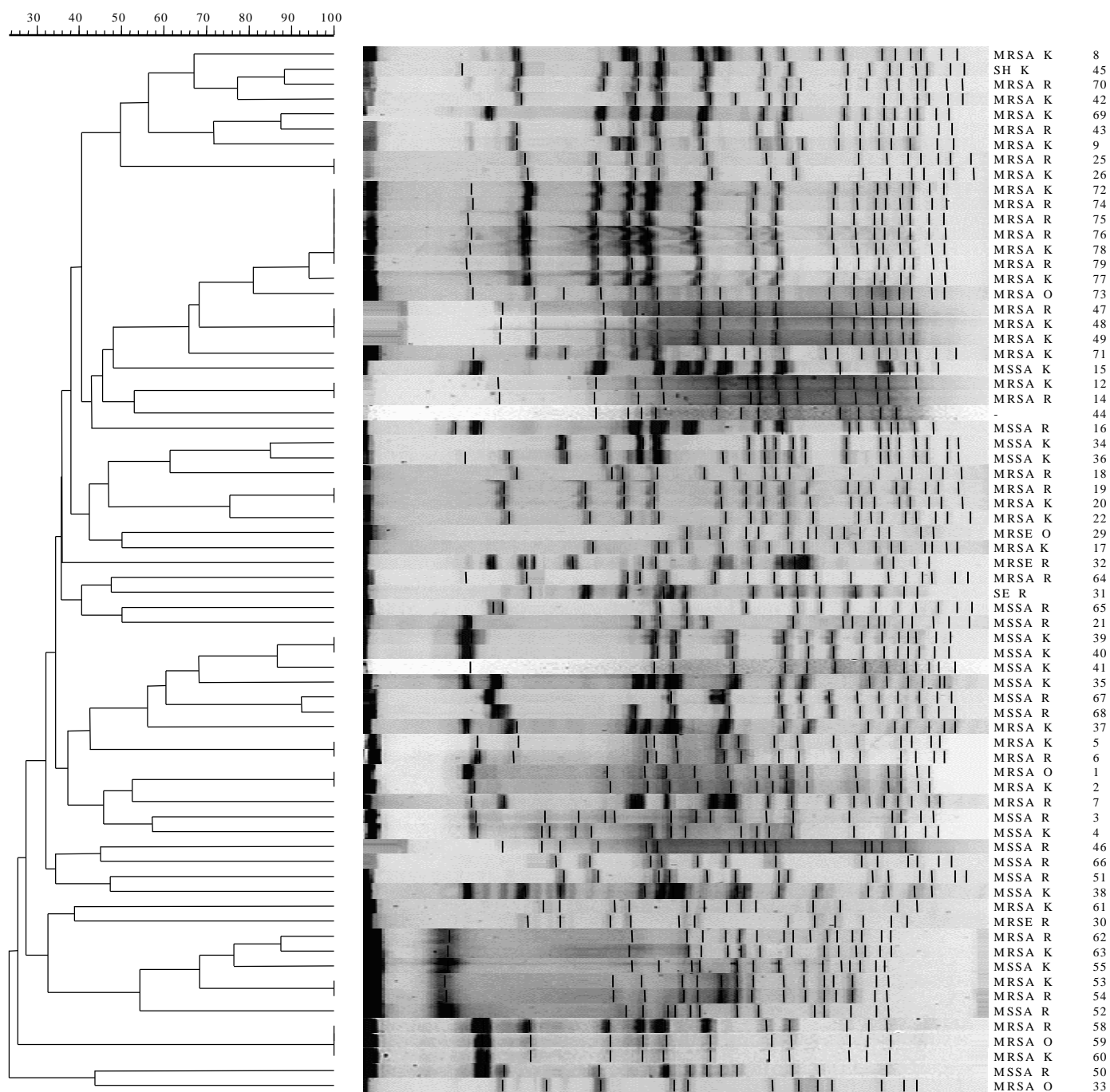
Fot. 20 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (34K, 36K, 42K, 61K, 64R) oraz (Rd) (45K, 51R, 65R).



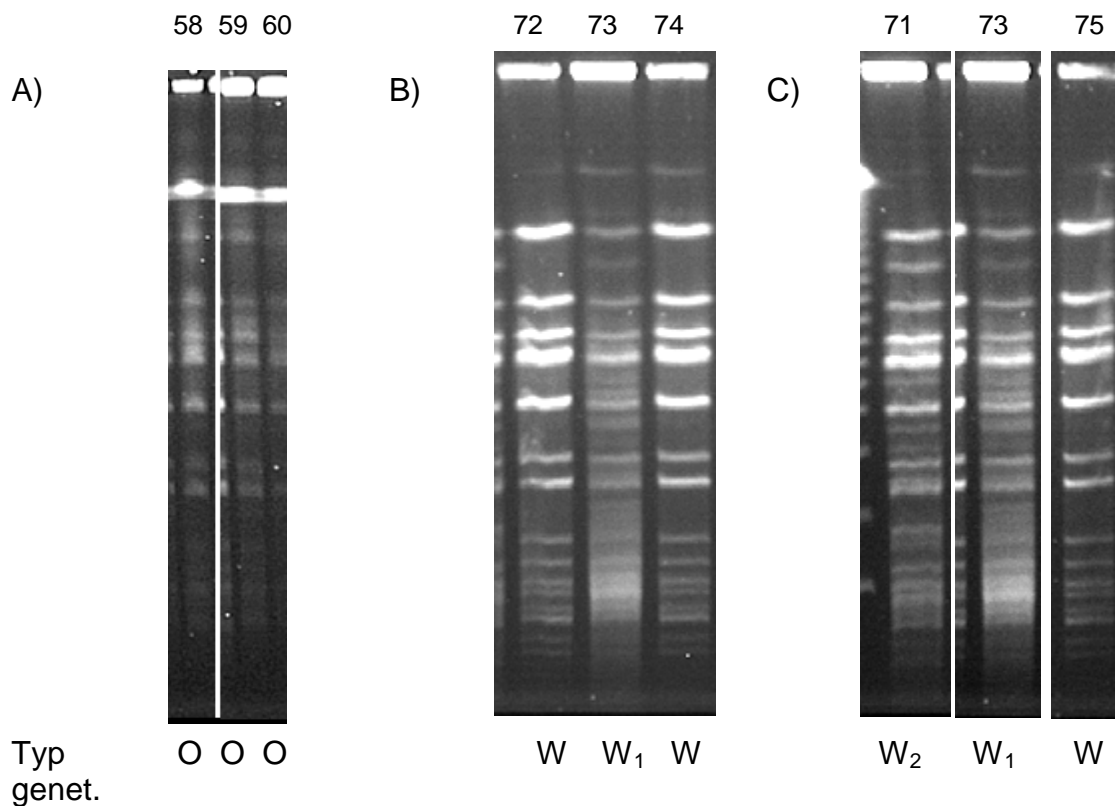
Fot. 21 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (15K, 16R, 39K, 40K, 69K, 70R) oraz z rany i odbytu pacjentów z OLO (P) (31R, 32R, 33O).



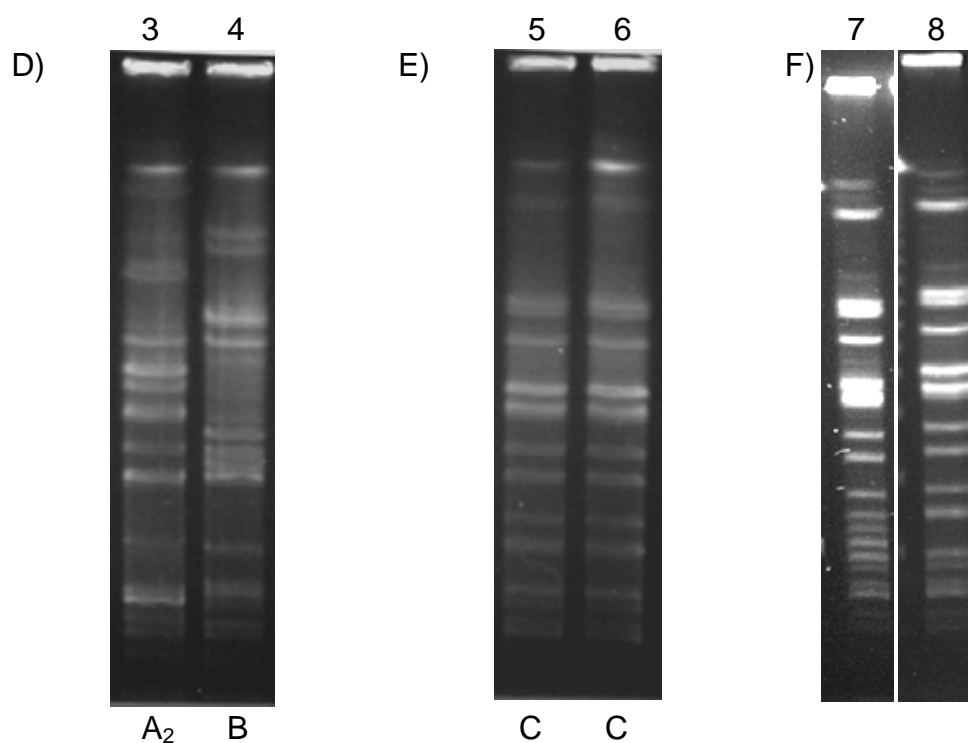
Fot. 22 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (8K, 9K, 43R, 70R) oraz (Rd) (66R, 67R, 68R).



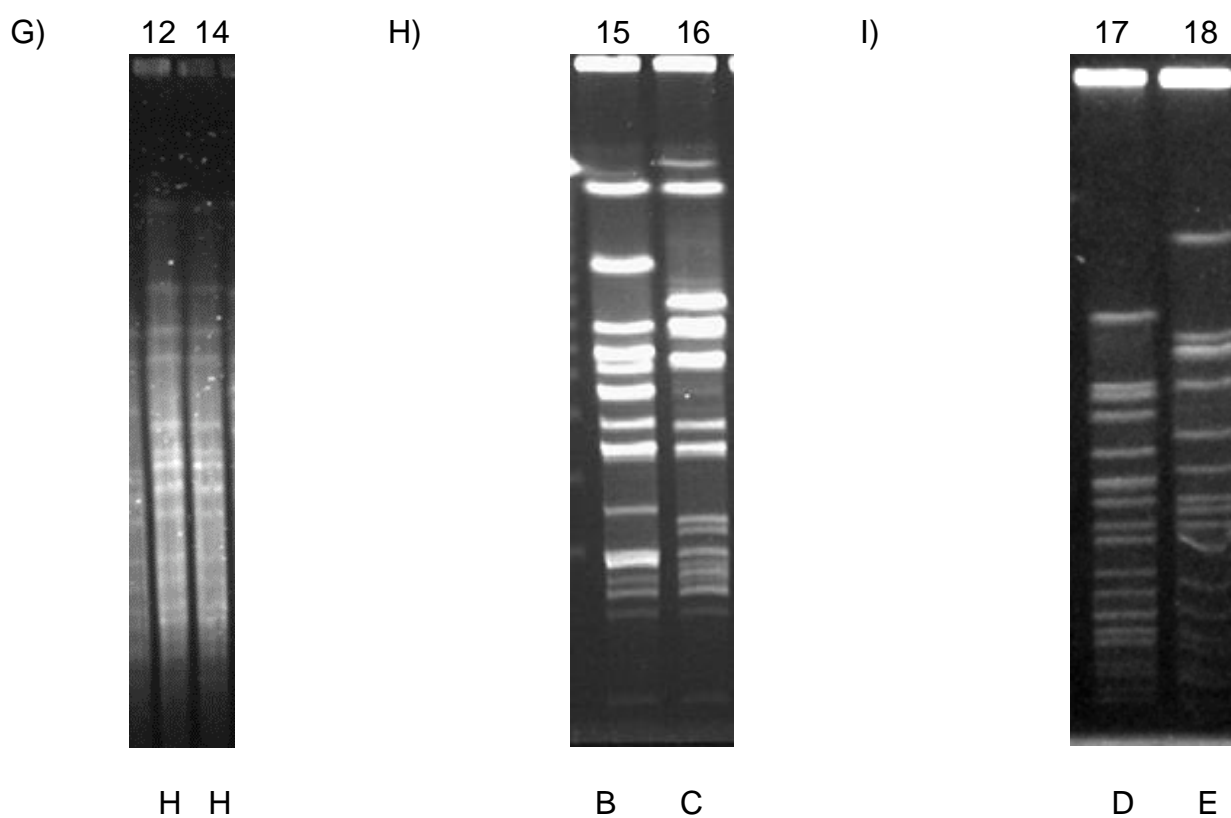
Ryc 10 Dendrogram wybranych szczepów *S. aureus* otrzymany przez porównanie genomowego DNA metodą PFGE.
Opracowanie wg programu Molecular Analyst (BioRad).



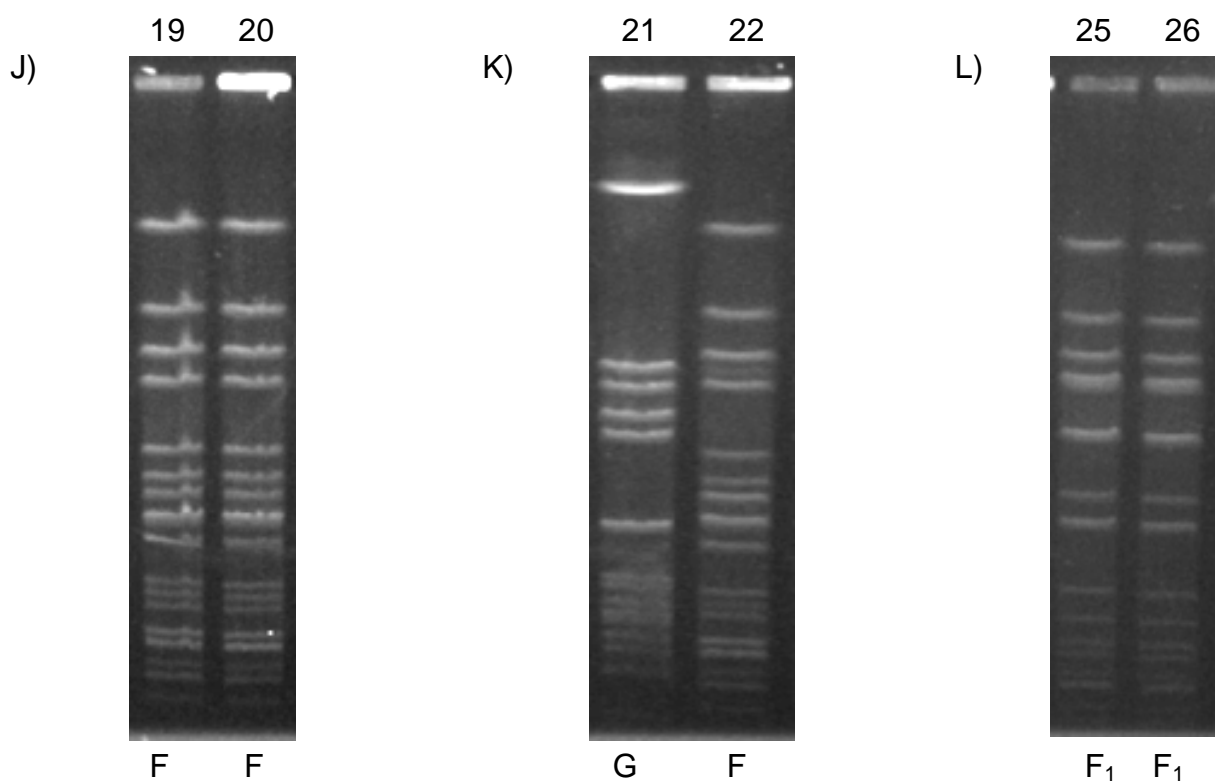
Fot. 23 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi, rany i odbytu pacjentów: A) Z.B. (58R, 59O, 60K), B) W.S. (72K, 73O, 74R) C) W.S. (71K, 73O, 75R).



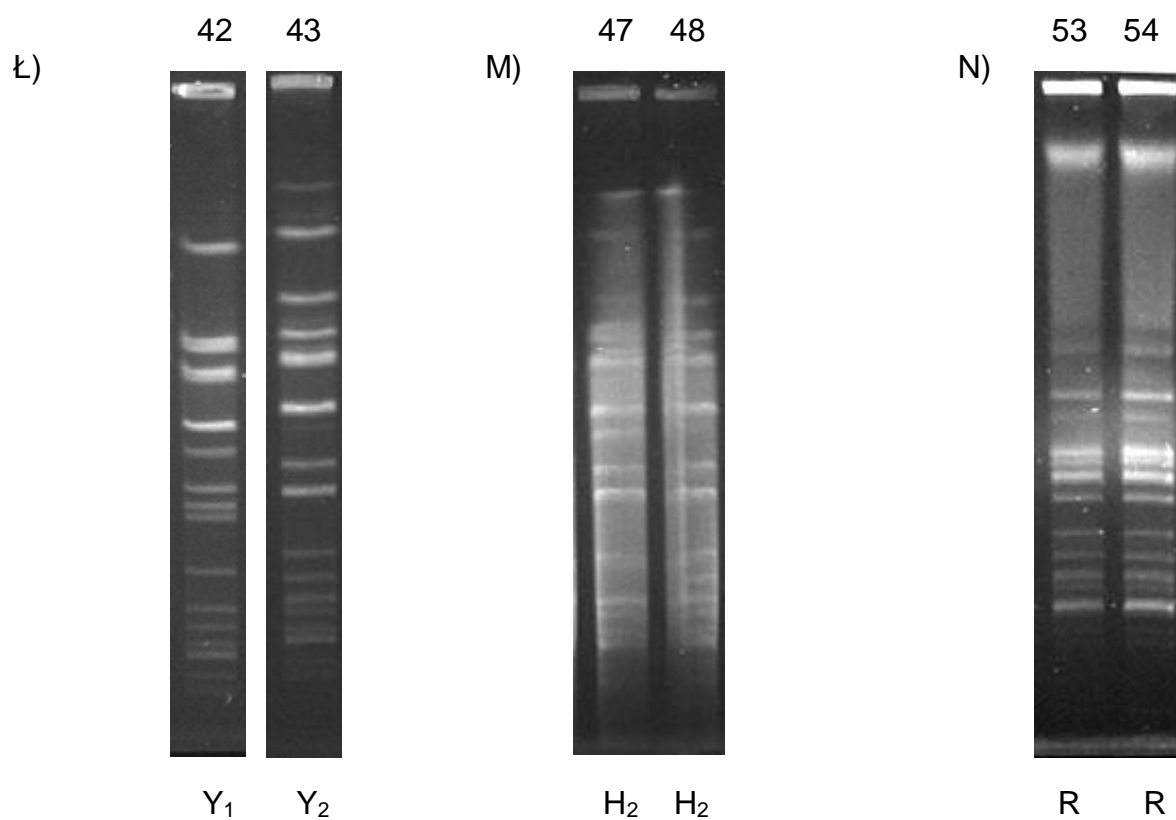
Fot. 24 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: D) J.D. (3R, 4K), E) M.H. (5K, 6R) F) R.K. (7R, 8K).



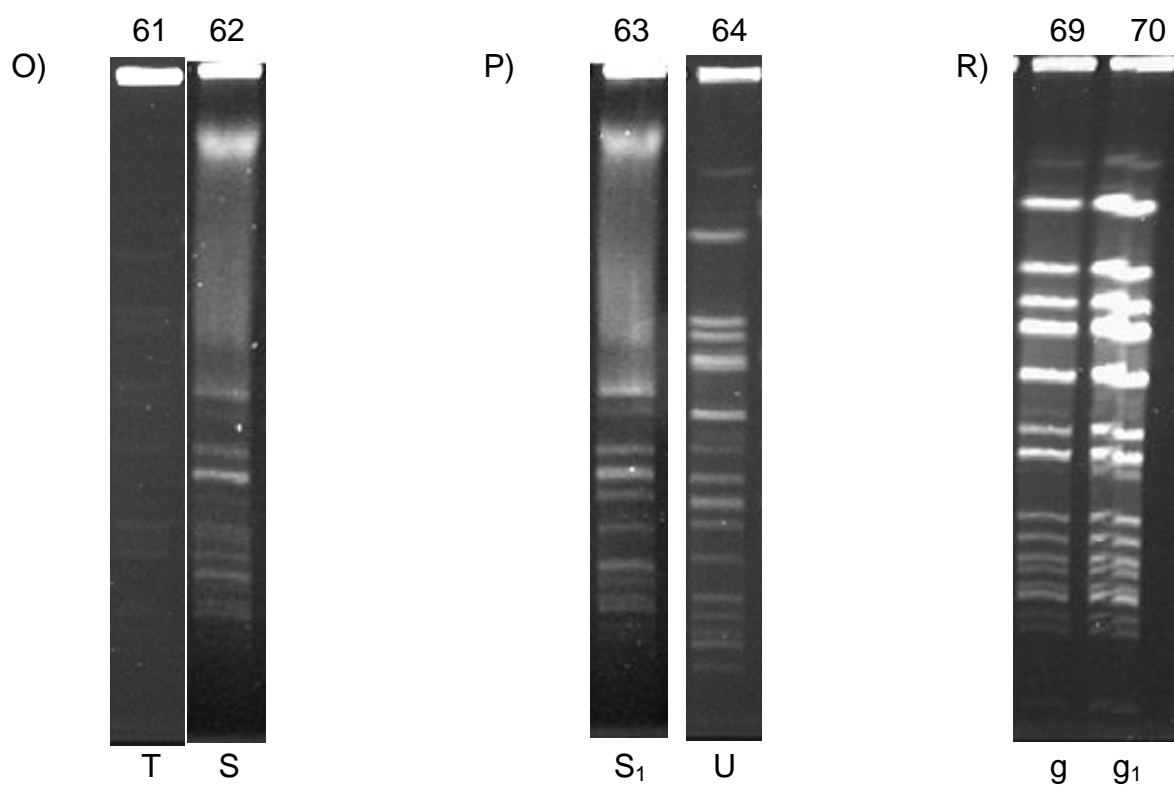
Fot. 25 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: G) H.K. (12K, 14R) H) A.S. (15K, 16R) I) T.M. (17K, 18R).



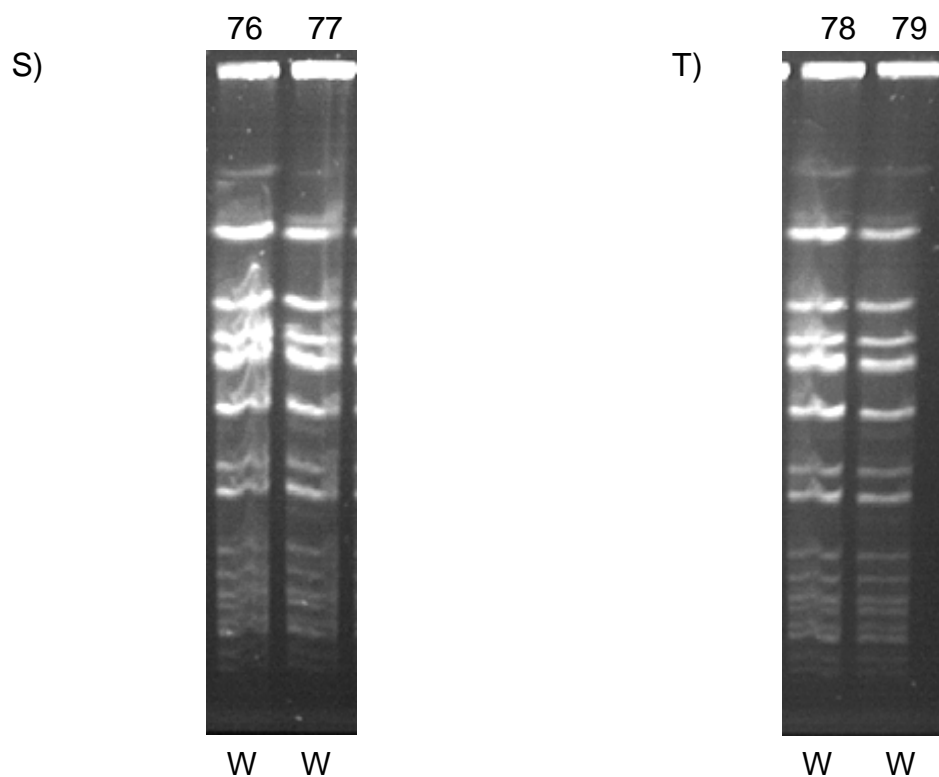
Fot. 26 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: J) P.S. (19R, 20K) K) A.C. (21R, 22K) L) Z.C. (25R, 26K).



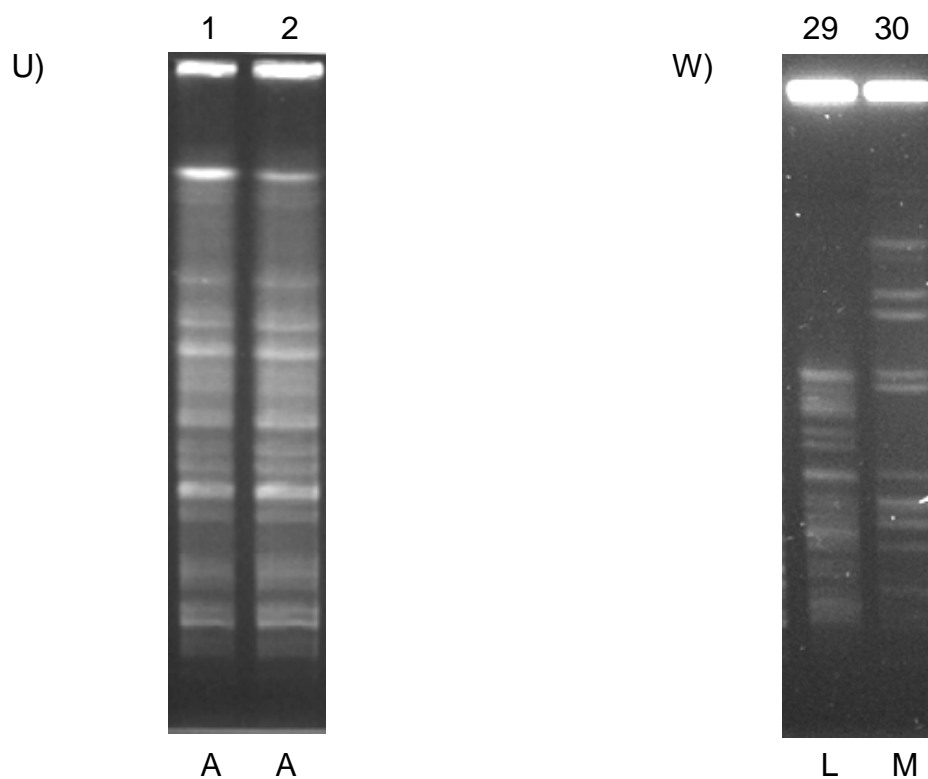
Fot. 27 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: Ł) L.H. (42K, 43R) M) H.G. (47R, 48K) N) S.B. (53K, 54R).



Fot. 28 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: O) L.H. (61K, 62R) P) M.W. (63K, 64R) R) L.H. (69K, 70R).



Fot. 29 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: S) A.H. (76K, 77R) T) M.N. (78K, 79R).



Fot. 30 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i odbytu pacjenta: U) S.C. (2K, 1O) W) J.S. (30R, 29O).

4.4 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus*, typem dzikim WT(25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.

Zastosowanie metody RT-PCR pozwoliło dokonać analizy nagromadzenia transkryptów cytokin (IL-8, TNF- α), które w komórkach spoczynkowych nie ulegają ekspresji lub też ich ekspresja jest bardzo słaba. W konsekwencji transkrypty (mRNA) dla tych genów pojawiają się w prawidłowych komórkach również na sygnał, ich transkrypcja jest szybka i prowadzi do szybkiej akumulacji mRNA. Po wyłączeniu transkrypcji mRNA bardzo szybko zanika, gdyż czas połowicznej degradacji mRNA cytokin jest zazwyczaj krótki (129).

Zatem w komórkach niestymulowanych ilość mRNA cytokin jest bardzo niewielka. RT-PCR, ze względu na silne wzmocnienie sygnału, umożliwia wykrycie podstawowego poziomu transkryptu cytokiny, a następnie pozwala zaobserwować jego przyrost.

Metodę RT-PCR można podzielić na cztery główne etapy (66, 67):

- Ø Izolację RNA
- Ø Odwrotna transkrypcja (RT)
- Ø Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
- Ø Analiza produktu.

Badania prowadzono na komórkach Caco-2, które były w różnych etapach hodowli. Komórki, tworzyły pojedynczą warstwę komórek (monolayer). W momencie kiedy komórki zetknęły się ze sobą błonami komórkowymi powstawały agragaty komórkowe – to stadium nazwano “confluent cells”.

Użyto nazwę angielską określającą to stadium, ze względu na mało precyzyjne tłumaczenie na język polski. “Confluent” oznacza “zlewający, zbiegający”.

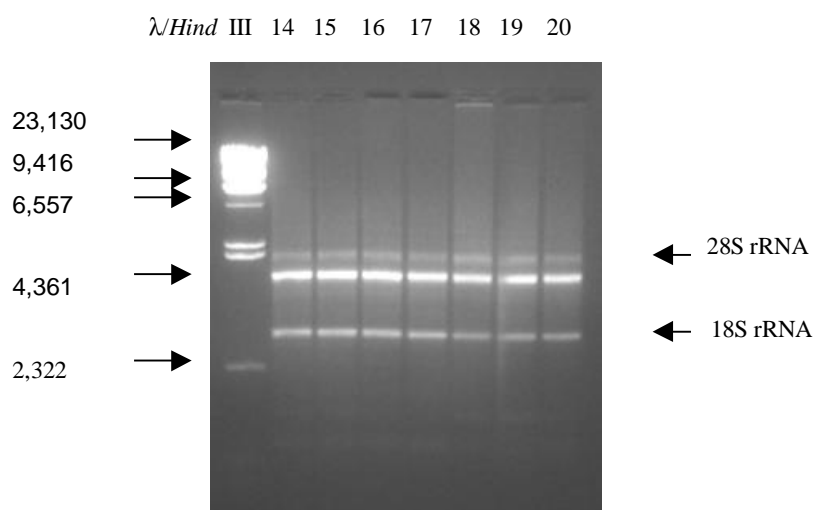
Kolejne etapy hodowli różniły się między sobą stopniem agregacji i wiekiem komórek, etap ten nazwano “post confluent cells” (po etapie “confluent cells”).

Izolacja RNA z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml, kom. w stadium - confluent cells CC) (14-20).

Nr próbki	Stężenie bakterii (CFU/ml)	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$)
14	kontrola	0,080	1,861	256,9
15	$5,6 \times 10^9$	0,081	1,923	258,7
16	$5,6 \times 10^8$	0,088	1,872	282,0
17	$5,6 \times 10^7$	0,090	1,855	288,7
18	$5,6 \times 10^6$	0,078	1,908	248,4
19	$5,6 \times 10^5$	0,082	1,904	263,5
20	$5,6 \times 10^4$	0,079	1,885	253,9

Tab. 24 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (14-20).

Elektroforeza RNA

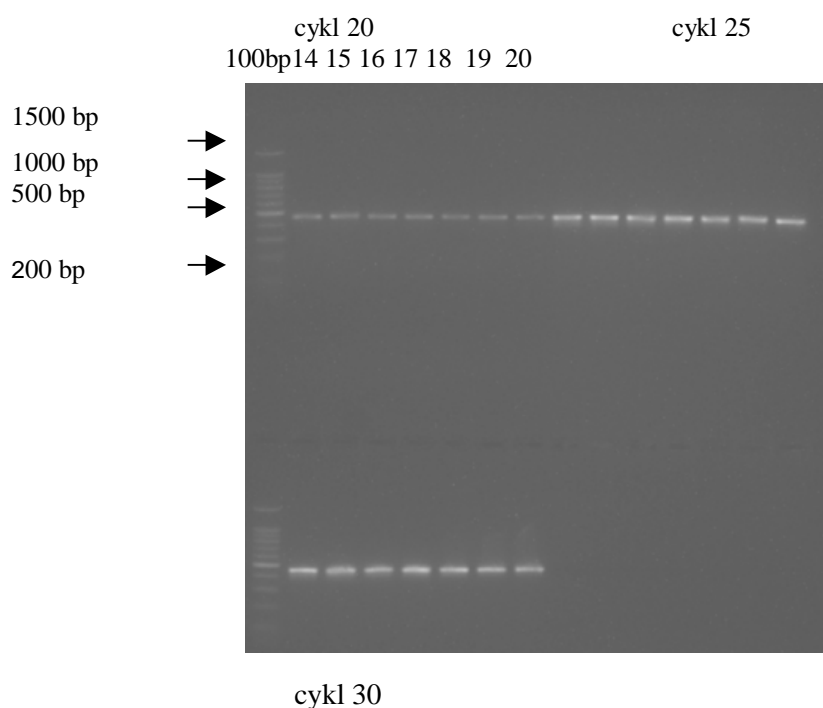


Fot. 31 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 14-20.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCR (Semi- quantitative Reverse Transcriptase Polymrerase Chain Reaction)

GAPDH (cykl 20-30), gen referencyjny

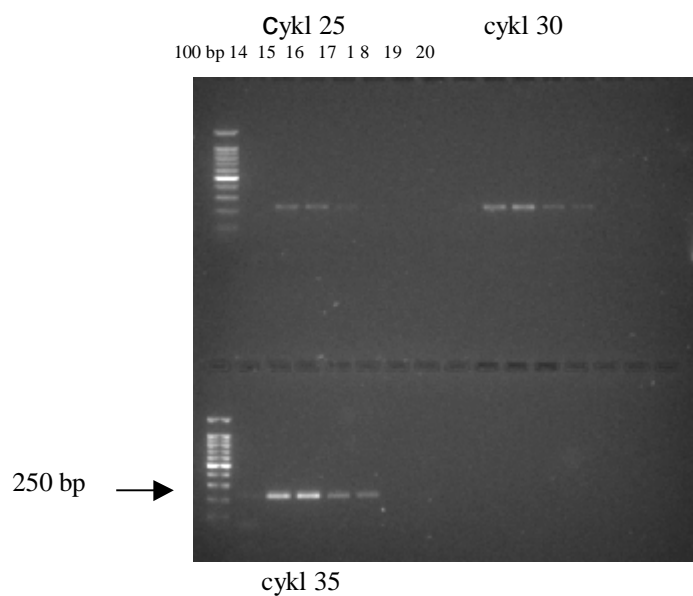
GAPDH - gen, który w danych warunkach nie podlega regulacji.



Fot. 32 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./m) po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^4 CFU/ml (14-20).

Tab. 25 Względna intensywność GAPDH (14-20).

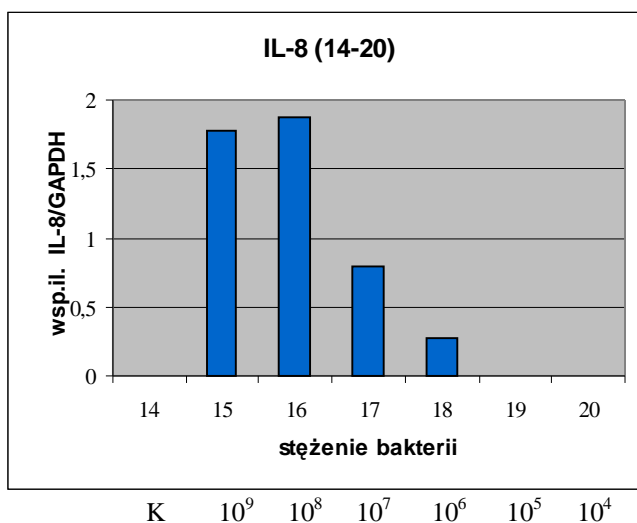
Nr próbki	Stężenie bakterii	względna intensywność GAPDH
14	Kontrola	61,122
15	$5,6 \times 10^9$	62,581
16	$5,6 \times 10^8$	58,288
17	$5,6 \times 10^7$	60,882
18	$5,6 \times 10^6$	49,054
19	$5,6 \times 10^5$	57,246
20	$5,6 \times 10^4$	58,656

IL-8 (cykl 25-35), (14-20)

Fot. 33 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^4 CFU/ml (14-20).

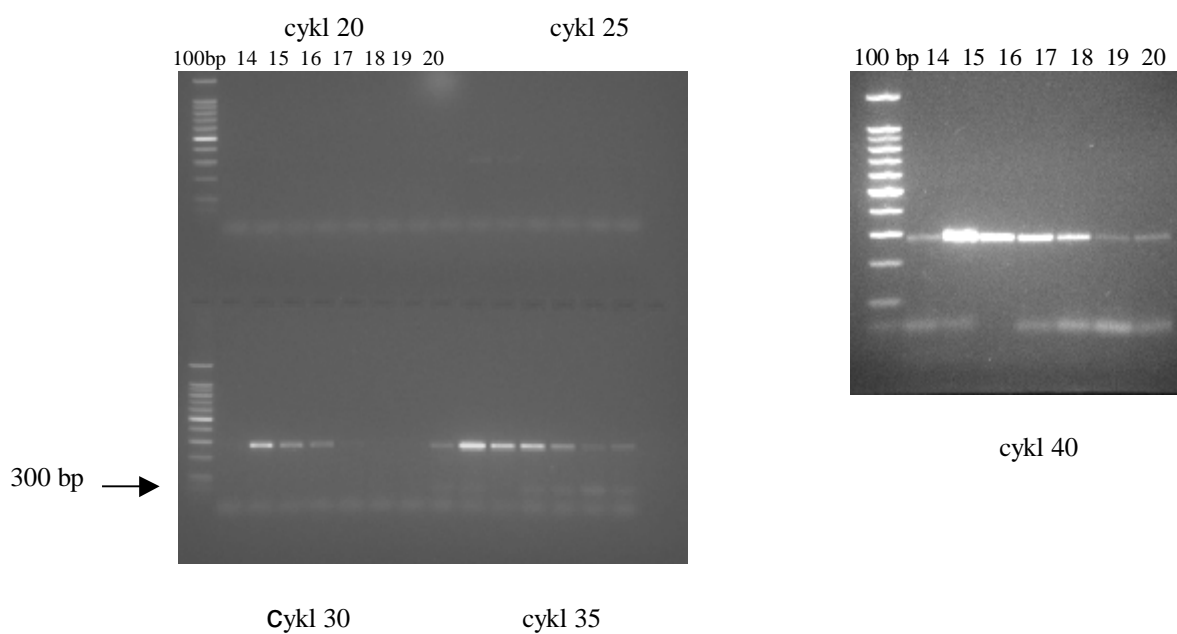
Tab. 26 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (14-20).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność IL-8	Względna intensywność GAPDH	współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH
14	Kontrola	0	61,122	0
15	$5,6 \times 10^9$	111,490	62,581	1,781
16	$5,6 \times 10^8$	109,434	58,288	1,877
17	$5,6 \times 10^7$	48,793	60,882	0,801
18	$5,6 \times 10^6$	13,556	49,054	0,276
19	$5,6 \times 10^5$	0	57,246	0
20	$5,6 \times 10^4$	0	58,656	0



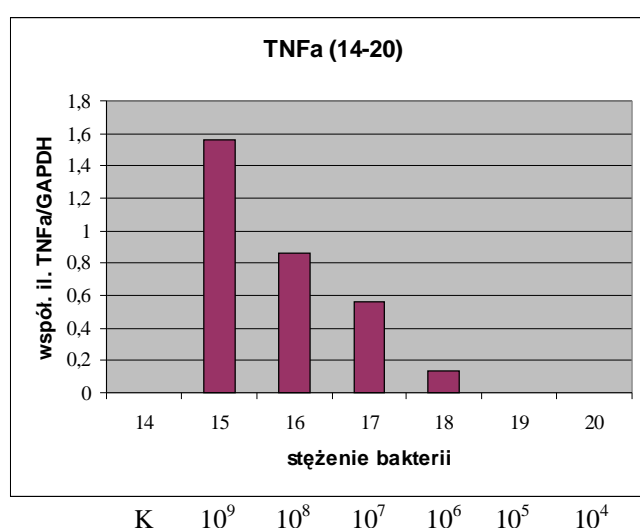
Ryc. 12 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^4 CFU/ml (14-20).

TNF- α (cykl 20-40) , (14-20)



Fot. 34 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^4 CFU/ml (14-20).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność TNF- α	Względna intensywność GAPDH	Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH
14	Kontrola	0	61,122	0
15	$5,6 \times 10^9$	97,432	62,581	1,56
16	$5,6 \times 10^8$	49,966	58,288	0,86
17	$5,6 \times 10^7$	34,122	60,882	0,56
18	$5,6 \times 10^6$	6,730	49,054	0,14
19	$5,6 \times 10^5$	0	57,246	0
20	$5,6 \times 10^4$	0	58,656	0

Tab. 27 Względna intensywność TNFa. Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH (14-20).Ryc.13 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) z gronkowcem złocistym WT 25923 z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^4 CFU/ml (14-20).

	IL-8	TNF α
Stęż. kom. bakt (14-20)	$10^9, 10^8, 10^7, 10^6$	$10^9, 10^8, 10^7, 10^6$

Tab. 28 Przyrost transkryptu IL-8 i TNFa w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (14-20).

Dzięki metodzie RT-PCR wykryto podstawowy poziom transkryptu cytokin : IL-8 i TNF- α oraz zaobserwowano jego przyrost w komórkach stymulowanych.

W komórkach Caco-2 w stadium CC (confluent cells) po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu 10^9 – 10^8 CFU/ml transkrypcja genu IL-8 była bardzo szybka

i prowadziła do szybkiej akumulacji mRNA, natomiast inkubacja o mniejszym stężeniu bakterii 10^7 - 10^6 CFU/ml, nie powodowała tak szybkiego przyrostu transkryptu lub nie pojawił się on wcale 10^5 - 10^4 CFU/ml.

W komórkach Caco-2 w stadium CC po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^6 CFU/ml zaobserwowano tendencję malejącą w przyroście transkryptu TNF- α , stężenie 10^5 – 10^4 CFU/ml nie było wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

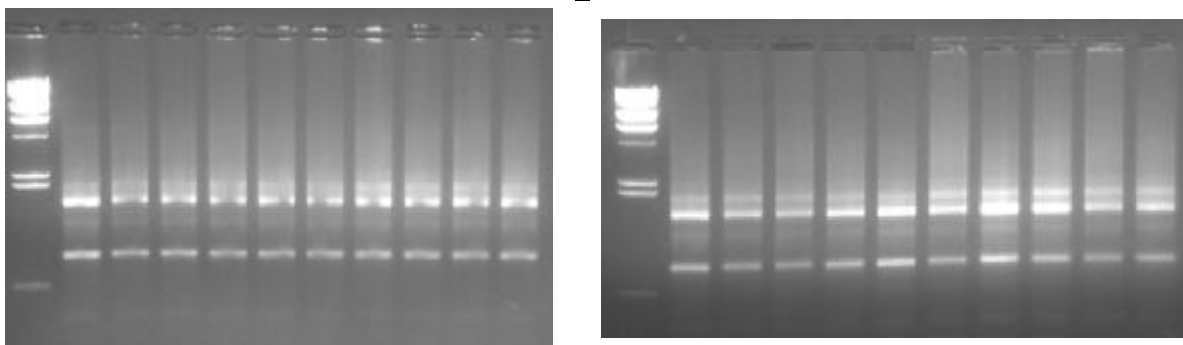
Izolacja RNA z komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) , w stadium 3 dni PC (79-88),
4 dni PC (89-98).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$)
79	kontrola	0,120	1,887	384,7
80	1×10^9	0,080	1,852	256,7
81	1×10^8	0,089	1,881	283,2
82	1×10^7	0,125	1,777	399,9
83	1×10^6	0,092	1,854	293,5
84	1×10^5	0,102	1,750	326,6
85	1×10^4	0,103	2,032	328,9
86	1×10^3	0,093	2,027	297,9
87	1×10^2	0,114	1,992	364,4
88	1×10^1	0,094	2,101	301,5
89	kontrola	0,115	2,069	367,4
90	1×10^9	0,112	2,029	359,9
91	1×10^8	0,071	2,212	226,8
92	1×10^7	0,104	2,011	333,2
93	1×10^6	0,111	1,939	356,0
94	1×10^5	0,114	1,965	365,1
95	1×10^4	0,297	1,743	951,2
96	1×10^3	0,144	1,888	459,4
97	1×10^2	0,130	1,866	415,4
98	1×10^1	0,130	1,922	414,4

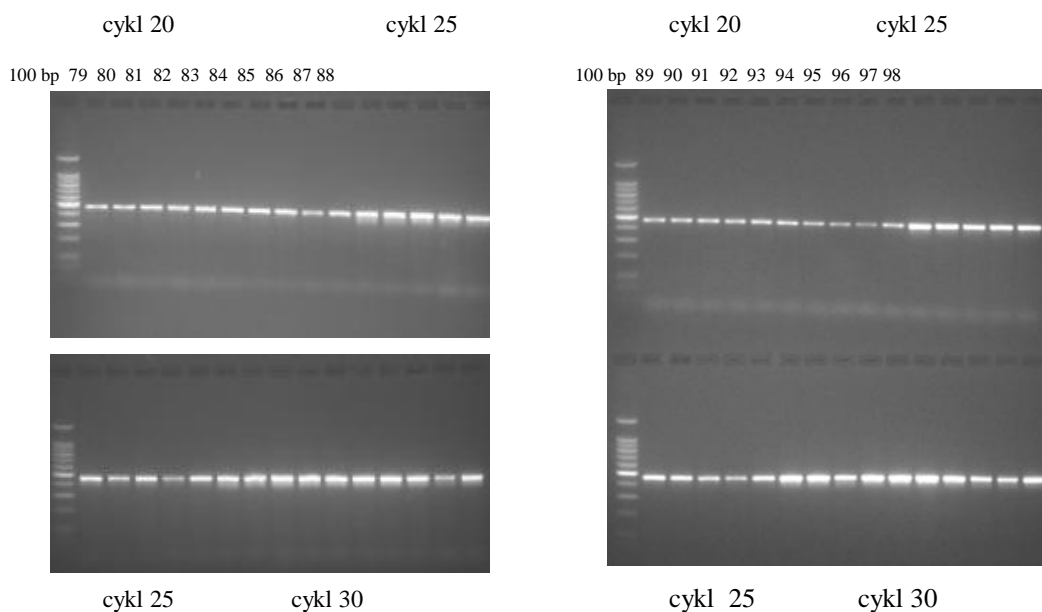
Tab. 29 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (79-98).

Elektroforeza RNA

λ /Hind III 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 λ /Hind III 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98



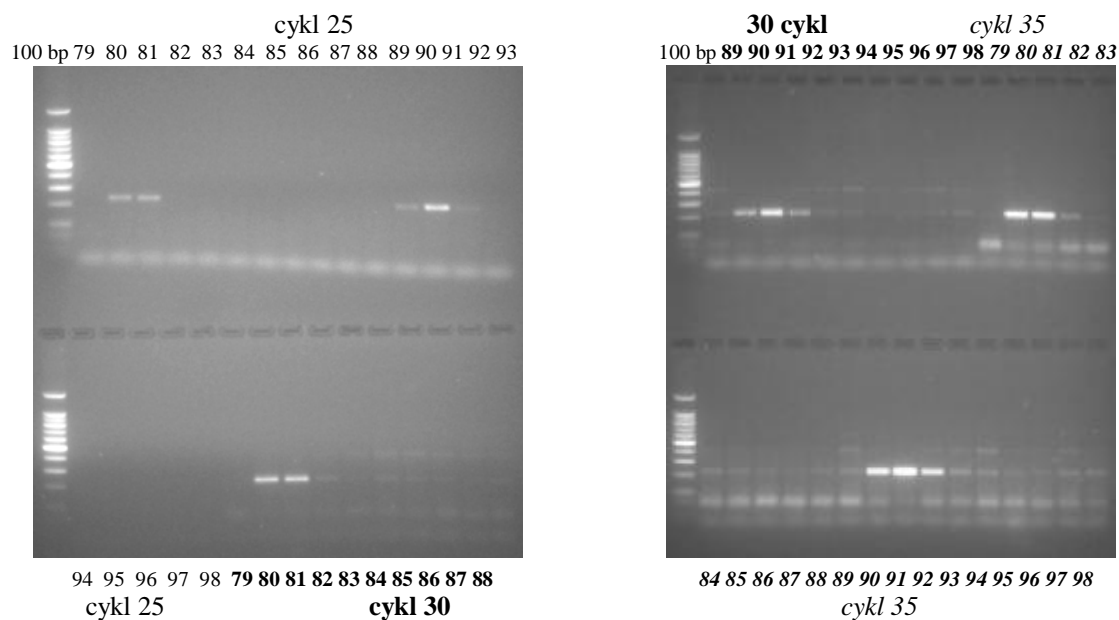
Fot. 35 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 79-98.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCRGAPDH (cykl 20-30), (79-88) 3 dni PC, (89-98) 4 dni PC).

Fot. 36 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^0 CFU/ml (79-88, 89-98).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność GAPDH
79	kontrola	83,5
80	1×10^9	84,6
81	1×10^8	86,1
82	1×10^7	87,3
83	1×10^6	88,6
84	1×10^5	89,0
85	1×10^4	87,0
86	1×10^3	89,3
87	1×10^2	84,2
88	1×10^1	87,4
89	kontrola	92,6
90	1×10^9	93,3
91	1×10^8	92,3
92	1×10^7	92,3
93	1×10^6	92,0
94	1×10^5	92,7
95	1×10^4	88,9
96	1×10^3	93,1
97	1×10^2	87,1
98	1×10^1	91,8

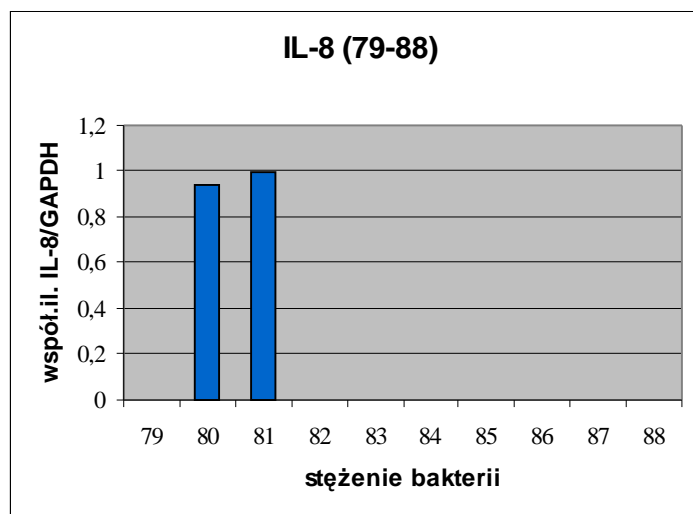
Tab. 30 Względna intensywność GAPDH (79-98).

IL-8 (cykl 25-35), (79-88) 3 PC, (89-98) 4 PC).

Fot. 37 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (79-88, 89-98).

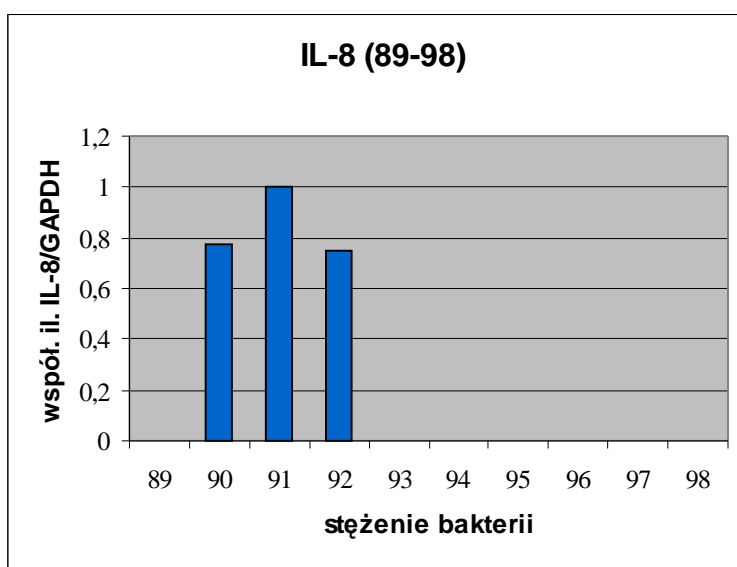
Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność IL-8 (25 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ. ilościowy IL-8/GAPDH
79	kontrola	0	83,5	0
80	1×10^9	79,4	84,6	0,938
81	1×10^8	85,5	86,1	0,993
82	1×10^7	0	87,3	0
83	1×10^6	0	88,6	0
84	1×10^5	0	89,0	0
85	1×10^4	0	87,0	0
86	1×10^3	0	89,3	0
87	1×10^2	0	84,2	0
88	1×10^1	0	87,4	0
89	kontrola	0	92,6	0
90	1×10^9	71,9	93,3	0,770
91	1×10^8	92,8	92,3	1,005
92	1×10^7	69,0	92,3	0,747
93	1×10^6	0	92,0	0
94	1×10^5	0	92,7	0
95	1×10^4	0	88,9	0
96	1×10^3	0	93,1	0
97	1×10^2	0	87,1	0
98	1×10^1	0	91,8	0

Tab. 31 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (79-98).



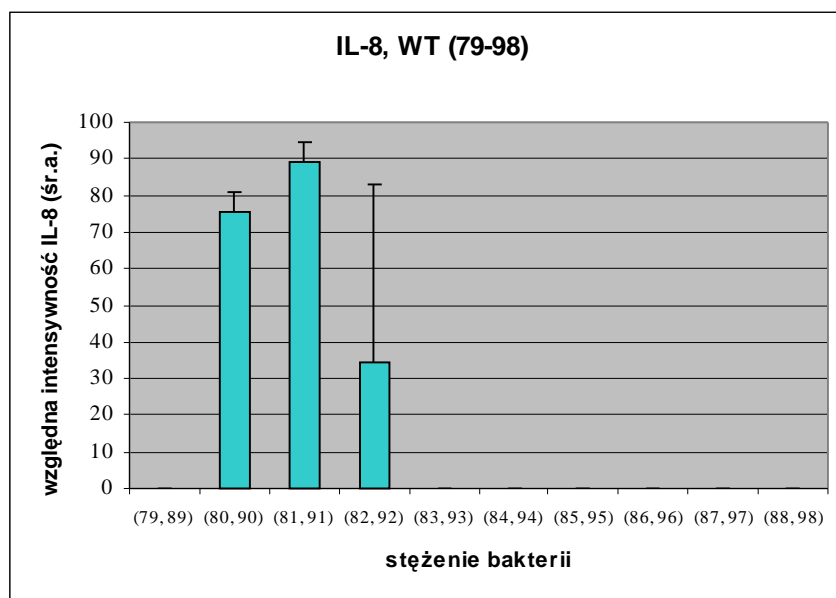
K 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1

Ryc. 14 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (79-88).

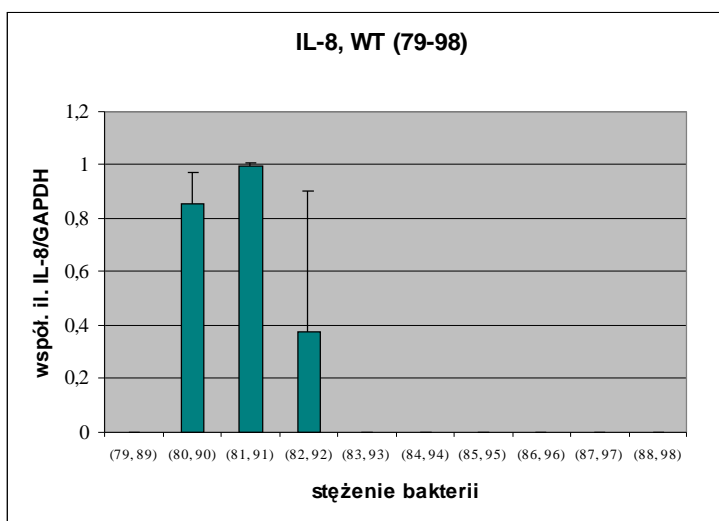


K 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1

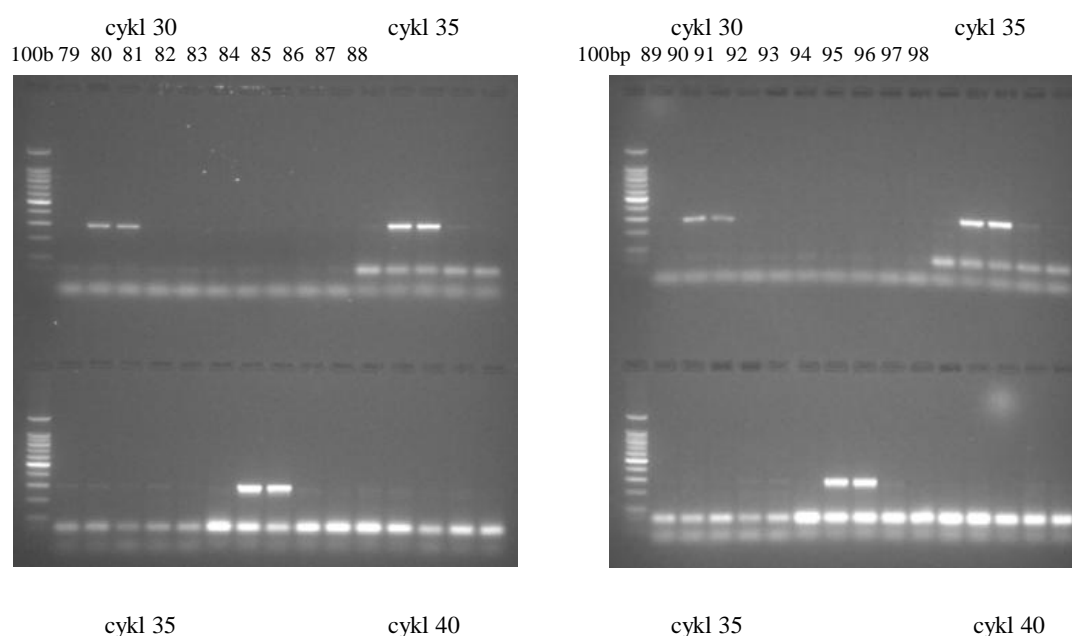
Ryc. 15 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (89-98).



Ryc. 16 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).



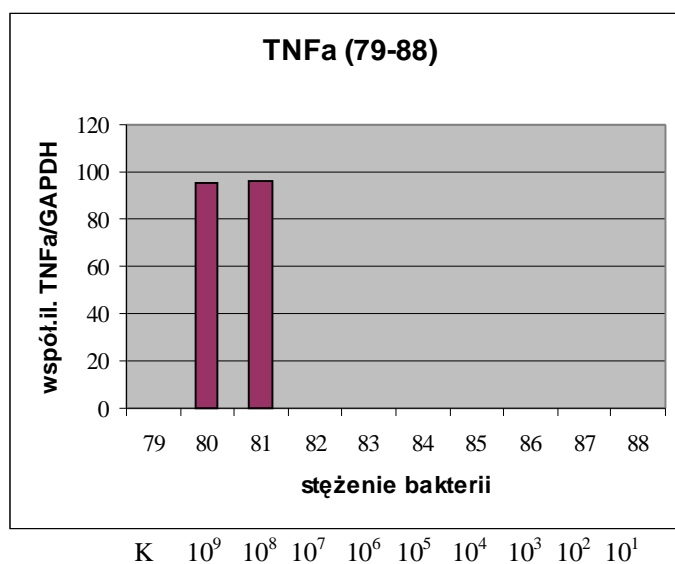
Ryc. 17 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współczynnik ilościowy) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).

TNF- α (cykl 20-40) , (79-88) 3 PC, (89-98) 4 PC

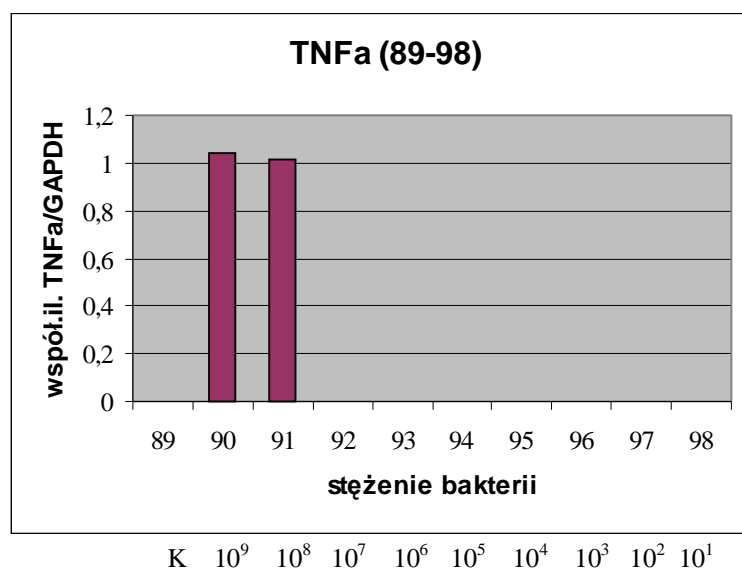
Fot. 38 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (79 –88, 89-98).

Tab. 32 Względna intensywność TNFa. Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH (79-98).

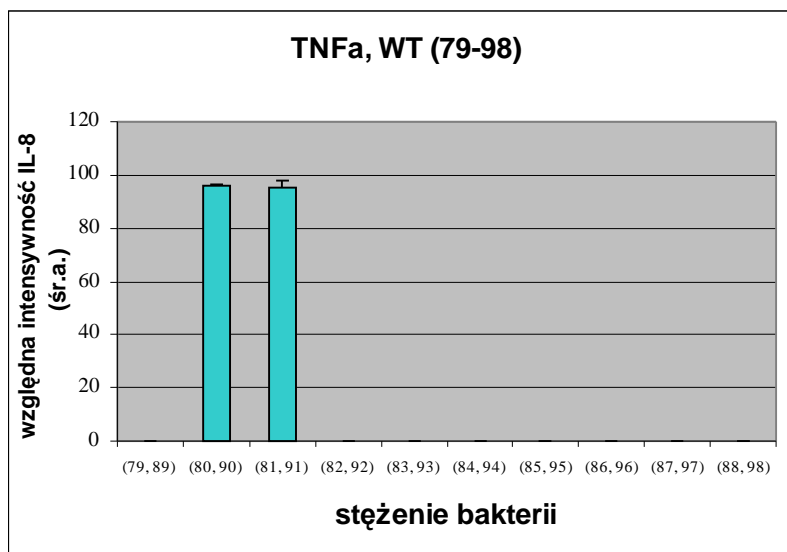
Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność TNF- α (30 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH
79	kontrola	0	83,5	0
80	1×10^9	95,6	84,6	1,130
81	1×10^8	96,1	86,1	1,116
82	1×10^7	0	87,3	0
83	1×10^6	0	88,6	0
84	1×10^5	0	89,0	0
85	1×10^4	0	87,0	0
86	1×10^3	0	89,3	0
87	1×10^2	0	84,2	0
88	1×10^1	0	87,4	0
89	kontrola	0	92,6	0
90	1×10^9	97,0	93,3	1,039
91	1×10^8	94,0	92,3	1,018
92	1×10^7	0	92,3	0
93	1×10^6	0	92,0	0
94	1×10^5	0	92,7	0
95	1×10^4	0	88,9	0
96	1×10^3	0	93,1	0
97	1×10^2	0	87,1	0
98	1×10^1	0	91,8	0



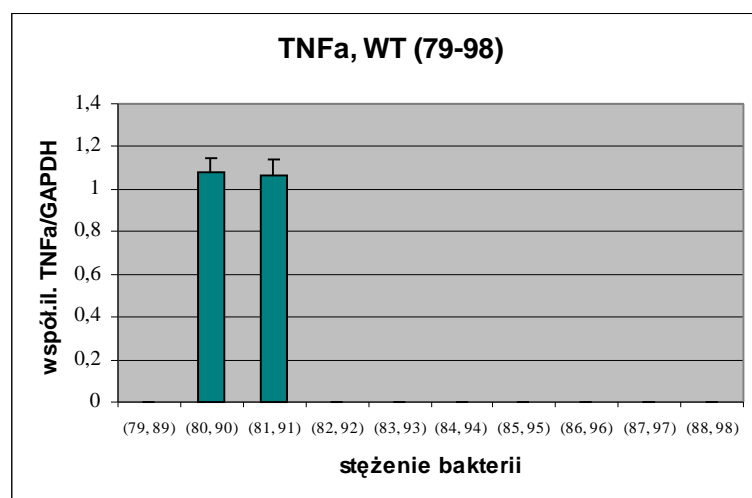
Ryc. 18 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (79-88).



Ryc. 19 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 (89-98).



Ryc. 20 Średni przyrost transkryptu TNFα (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).



Ryc. 21 Średni przyrost transkryptu TNFα (współ. il.) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).

Cytokiny	(79-88) 3 PC	(89-98) 4 PC
IL-8	$10^9, 10^8$	$10^9, 10^8, 10^7$
TNFα	$10^9, 10^8$	$10^9, 10^8$

Tab. 33 Przyrost transkryptu IL-8 i TNF α w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).

W komórkach Caco-2 w stadium 3 dni PC (79-88) po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu 10^9 – 10^8 CFU/ml transkrypcja IL-8 była bardzo szybka i prowadziła do akumulacji mRNA, natomiast inkubacja o mniejszym stężeniu bakterii 10^7 - 10^1 CFU/ml nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

W komórkach Caco-2 w stadium 4 dni PC (89-98) po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu 10^9 – 10^7 CFU/ml zaobserwowano przyrost transkryptu IL-8, natomiast o mniejszym stężeniu bakterii 10^6 - 10^1 CFU/ml nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

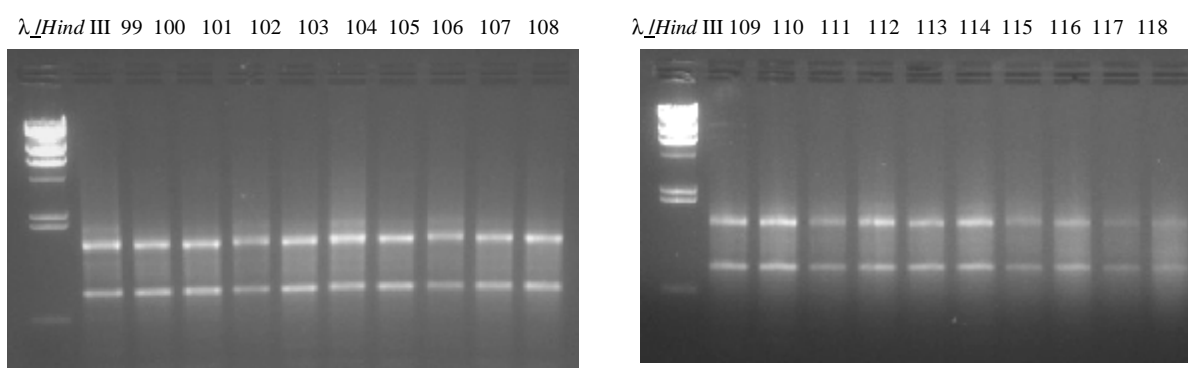
W komórkach Caco-2 zarówno w stadium 3 dni jak i 4 dni PC (79-98), po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^8 CFU/ml zaobserwowano szybki przyrost transkryptu TNF- α , natomiast stężenie 10^7 – 10^1 CFU/ml nie było wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

Izolacja RNA z komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) (99-108) w stadium 11-12 dni PC, (109-118) w stadium 5-6 dni PC).

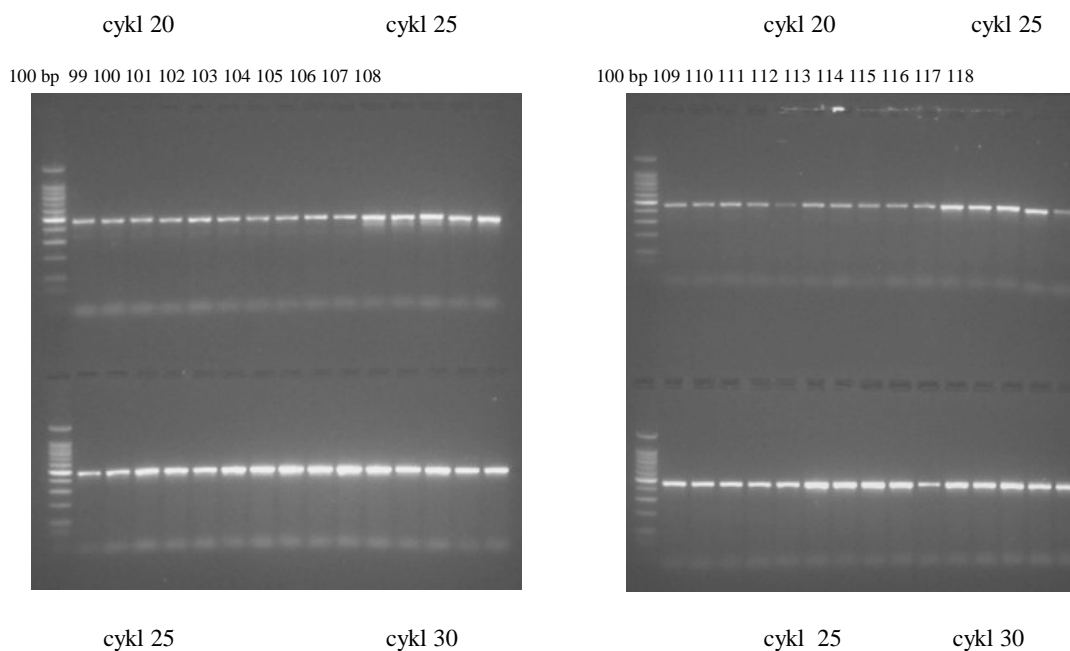
Nr próbki	Stężenie bakterii	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$)
99	kontrola	0,129	1,952	414,0
100	1×10^9	0,106	1,959	338,8
101	1×10^8	0,103	1,962	330,3
102	1×10^7	0,082	1,873	263,6
103	1×10^6	0,132	1,900	423,7
104	1×10^5	0,131	1,910	417,6
105	1×10^4	0,097	1,920	311,0
106	1×10^3	0,093	1,991	298,4
107	1×10^2	0,106	1,924	338,3
108	1×10^1	0,123	1,958	392,0
109	kontrola	0,057	1,990	182,6
110	1×10^9	0,075	1,991	240,8
111	1×10^8	0,044	1,894	139,3
112	1×10^7	0,063	1,986	202,8
113	1×10^6	0,051	2,030	164,4
114	1×10^5	0,063	1,967	201,7
115	1×10^4	0,043	1,900	137,4
116	1×10^3	0,061	1,933	196,2
117	1×10^2	0,032	2,031	101,4
118	1×10^1	0,058	2,010	184,4

Tab. 34 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (99-118).

Elektroforeza RNA



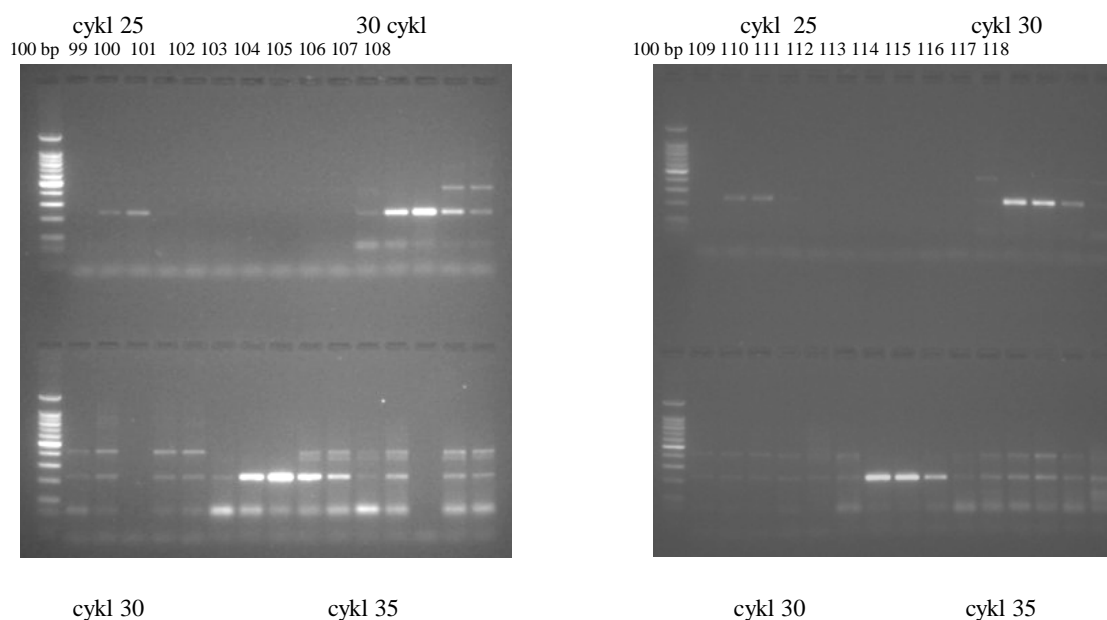
Fot. 39 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 99-118.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCRGAPDH (cykl 20-30), (99-108) 11-12 dni PC, (109-118) 5-6 dni PC).

Fot. 40 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (99-108, 110-118).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność GAPDH
99	kontrola	89,0
100	1×10^9	86,3
101	1×10^8	88,2
102	1×10^7	85,8
103	1×10^6	90,9
104	1×10^5	88,4
105	1×10^4	88,0
106	1×10^3	87,5
107	1×10^2	88,4
108	1×10^1	88,8
109	kontrola	90,9
110	1×10^9	88,3
111	1×10^8	86,0
112	1×10^7	86,1
113	1×10^6	86,7
114	1×10^5	90,2
115	1×10^4	87,5
116	1×10^3	87,7
117	1×10^2	87,2
118	1×10^1	88,8

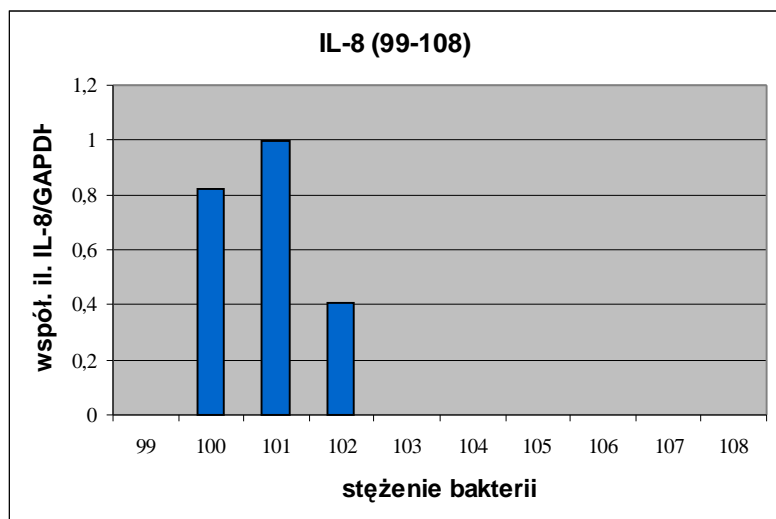
Tab. 35 Względna intensywność GAPDH (99-118).

IL-8 (cykl 25-35), (99-108) 11-12 dni PC, (109-118) 5-6 dni PC).

Fot. 41 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^1 (99-108, 109-118).

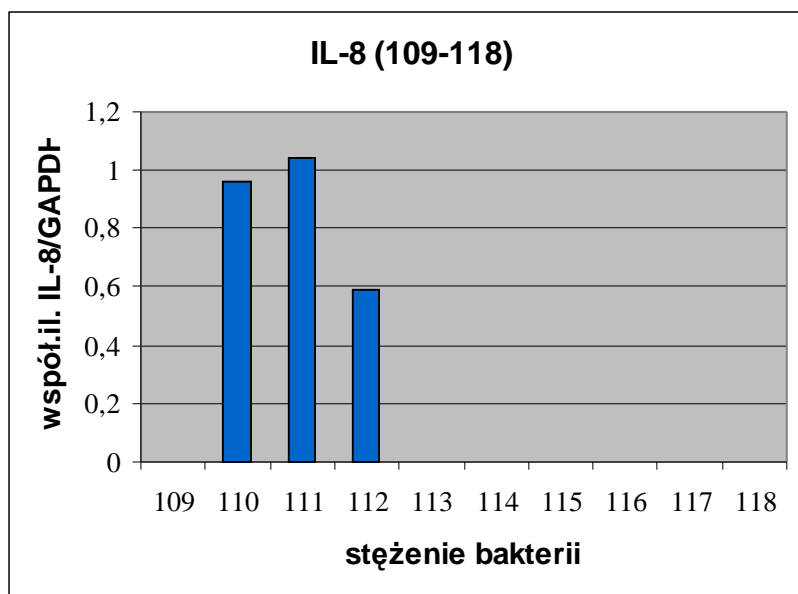
Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność IL-8 (25 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ. ilościowy IL-8/GAPDH
99	kontrola	0	89,0	0
100	1×10^9	71,1	86,3	0,823
101	1×10^8	87,9	88,2	0,996
102	1×10^7	34,9	85,8	0,406
103	1×10^6	0	90,9	0
104	1×10^5	0	88,4	0
105	1×10^4	0	88,0	0
106	1×10^3	0	87,5	0
107	1×10^2	0	88,4	0
108	1×10^1	0	88,8	0
109	kontrola	0	90,9	0
110	1×10^9	84,7	88,3	0,959
111	1×10^8	89,6	86,0	1,041
112	1×10^7	50,7	86,1	0,588
113	1×10^6	0	86,7	0
114	1×10^5	0	90,2	0
115	1×10^4	0	87,5	0
116	1×10^3	0	87,7	0
117	1×10^2	0	87,2	0
118	1×10^1	0	88,8	0

Tab.36 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (99-118).



K 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1

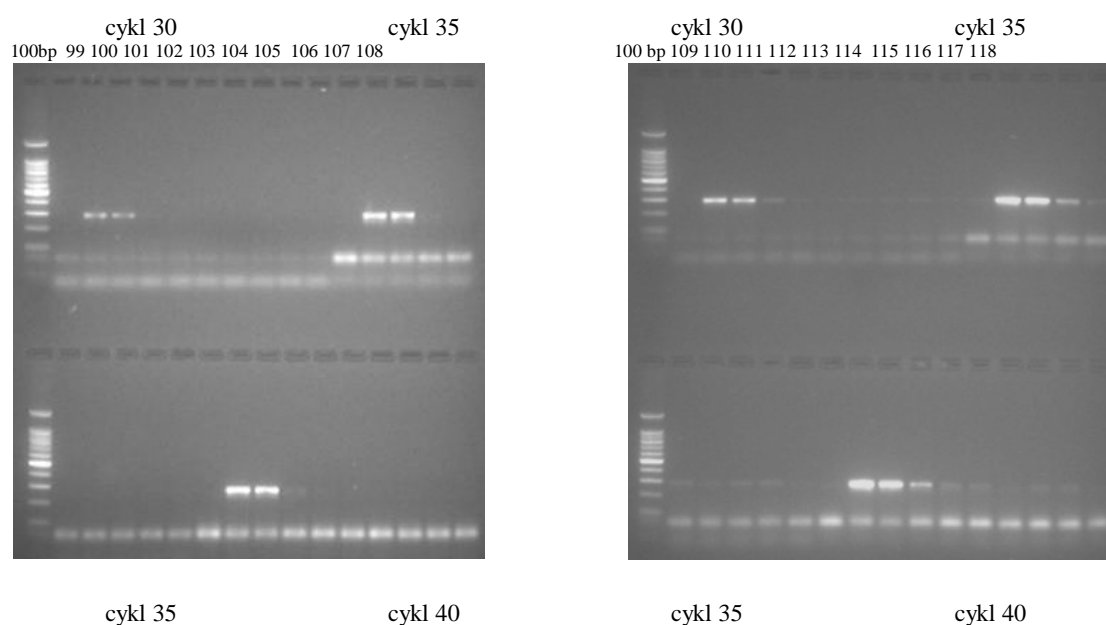
Ryc. 22 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (99-108).



K 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1

Ryc. 23 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (109-118).

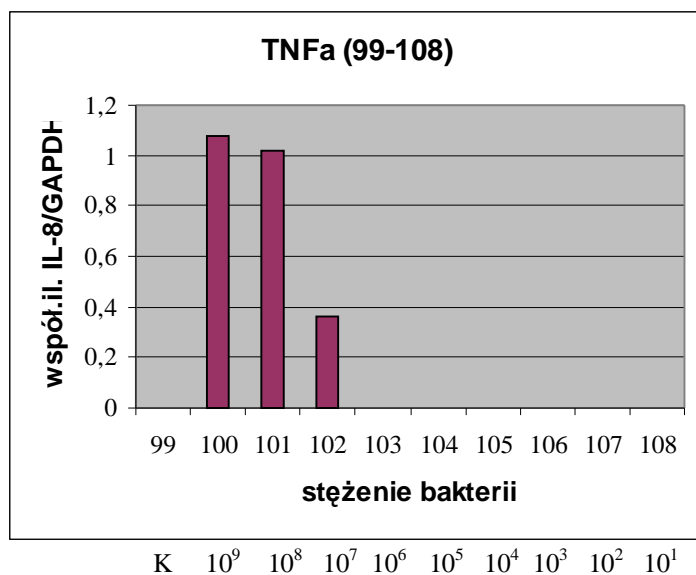
TNF- α (cykl 20-40) , (99-108) 11-12 dni PC, (109-118) 5-6 dni PC



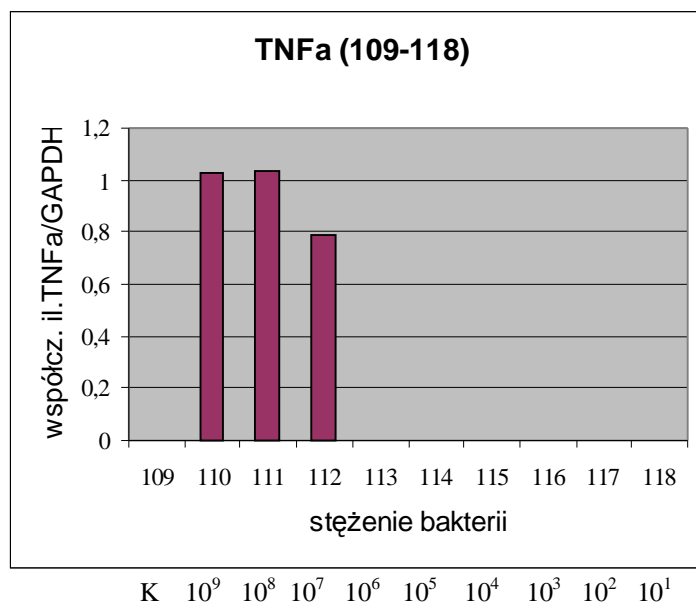
Fot. 42 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (99–108,109-118).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność TNF- α (30 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ. ilościowy TNF- α /GAPDH
99	kontrola	0	89,0	0
100	1×10^9	92,8	86,3	1,075
101	1×10^8	90,1	88,2	1,021
102	1×10^7	31,0	85,8	0,361
103	1×10^6	0	90,9	0
104	1×10^5	0	88,4	0
105	1×10^4	0	88,0	0
106	1×10^3	0	87,5	0
107	1×10^2	0	88,4	0
108	1×10^1	0	88,8	0
109	kontrola	0	90,9	0
110	1×10^9	90,9	88,3	1,029
111	1×10^8	89,2	86,0	1,037
112	1×10^7	67,6	86,1	0,785
113	1×10^6	0	86,7	0
114	1×10^5	0	90,2	0
115	1×10^4	0	87,5	0
116	1×10^3	0	87,7	0
117	1×10^2	0	87,2	0
118	1×10^1	0	88,8	0

Tab. 37 Względna intensywność TNFa. Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH (99-118).



Ryc. 24 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (99-108).



Ryc. 25 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 (109-118).

Cytokiny	(99-108) 11-12 PC	(109-118) 5-6 PC
IL-8	10 ⁹ , 10 ⁸ , 10 ⁷	10 ⁹ , 10 ⁸ , 10 ⁷
TNFa	10 ⁹ , 10 ⁸ , 10 ⁷	10 ⁹ , 10 ⁸ , 10 ⁷

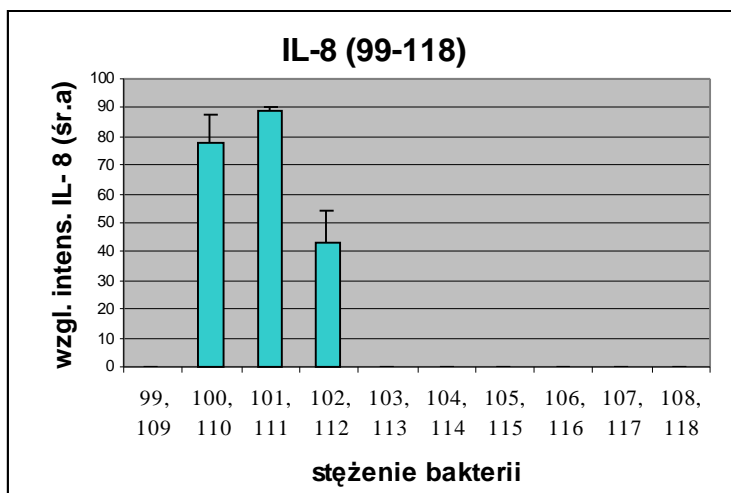
Tab. 38 Przyrost transkryptu IL-8 i TNFa w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).

W komórkach Caco-2 w stadium 5-6 dni PC (109-118) jak i 11-12 dni PC (99-108), po inkubacji z gronkowcem złocistym, typem dzikim (WT) o stężeniu 10⁹–10⁷ CFU/ml transkrypcja IL-8 i TNFa była bardzo szybka i prowadziła do szybkiej akumulacji mRNA, natomiast inkubacja o mniejszym stężeniu bakterii (10⁶-10¹) nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

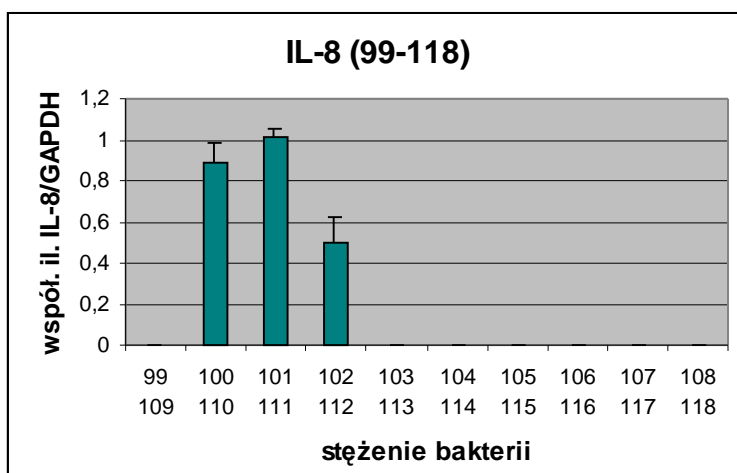
Na podstawie wyników doświadczenia można przypuszczać, że stadium PC komórek Caco-2 nie wpływa na akumulację transkryptów cytokin IL-8 i TNFa.

W związku z tym, dokonano uśrednienia wyników i policzono odchylenie standardowe, które umieszczono na wykresie.

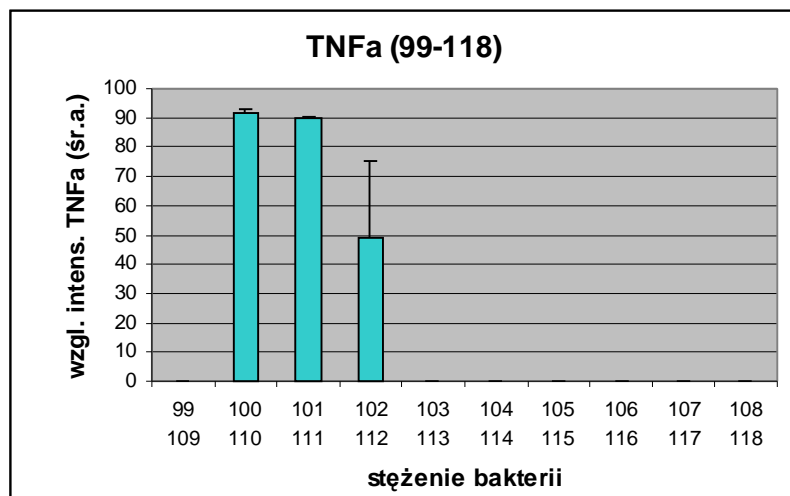
Zestawienie wyników (99-118).



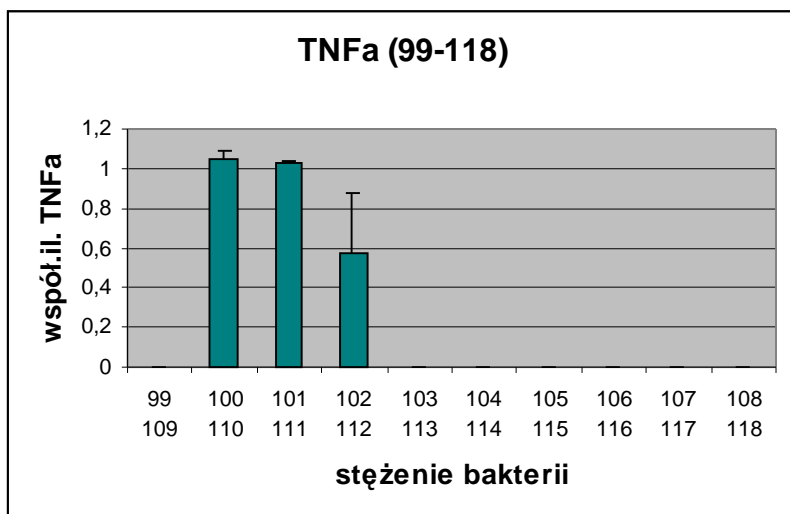
Ryc. 26 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).



Ryc. 27 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współczynnik ilościowy) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).



Ryc. 28 Średni przyrost transkryptu TNFa (wzgl. intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).



Ryc. 29 Średni przyrost transkryptu TNFa (współ. il.) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).

4.5 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus*, typem dzikim (WT, 25923) i mutantem (MT, 10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.

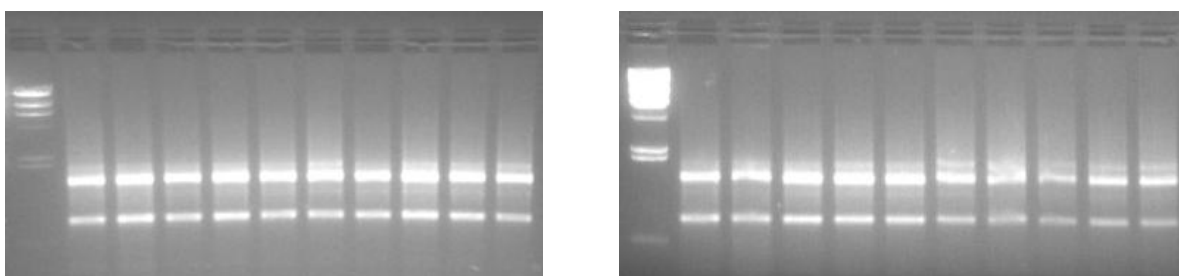
Izolacja RNA z komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml, w stadium 3-4 dni PC), 119- 128 WT, 129-138 MT.

Nr próbki	Stężenie bakterii	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$)
119	Kontrola	0,084	1,930	270,3
120	$0,5 \times 10^9$	0,096	1,910	306,0
121	$0,5 \times 10^8$	0,083	1,899	265,9
122	$0,5 \times 10^7$	0,079	2,012	252,2
123	$0,5 \times 10^6$	0,075	2,014	239,5
124	$0,5 \times 10^5$	0,071	2,106	225,8
125	$0,5 \times 10^4$	0,057	2,106	182,4
126	$0,5 \times 10^3$	0,096	1,990	306,3
127	$0,5 \times 10^2$	0,079	1,981	251,5
128	$0,5 \times 10^1$	0,072	2,001	231,2
129	Kontrola	0,080	1,995	255,2
130	$1,5 \times 10^9$	0,094	1,688	300,4
131	$1,5 \times 10^8$	0,078	1,950	251,0
132	$1,5 \times 10^7$	0,104	1,973	331,3
133	$1,5 \times 10^6$	0,076	2,048	242,6
134	$1,5 \times 10^5$	0,075	2,043	240,2
135	$1,5 \times 10^4$	0,061	2,180	194,9
136	$1,5 \times 10^3$	0,058	2,119	184,8
137	$1,5 \times 10^2$	0,055	2,116	177,5
138	$1,5 \times 10^1$	0,070	1,907	223,5

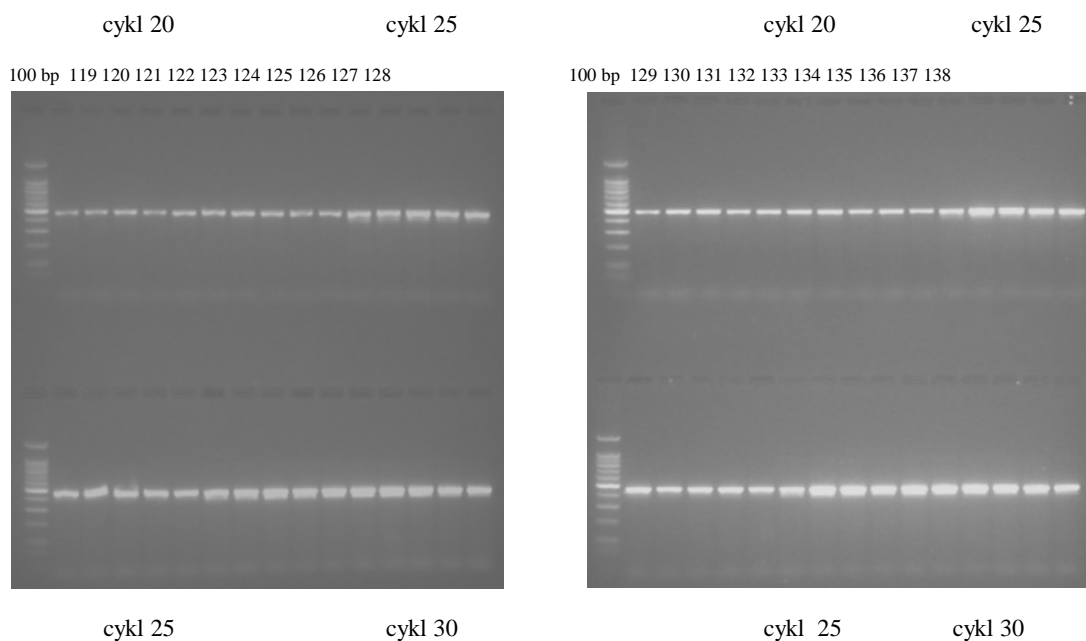
Tab. 39 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (119-138).

Elektroforeza RNA

λ /Hind III 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 λ /Hind III 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138



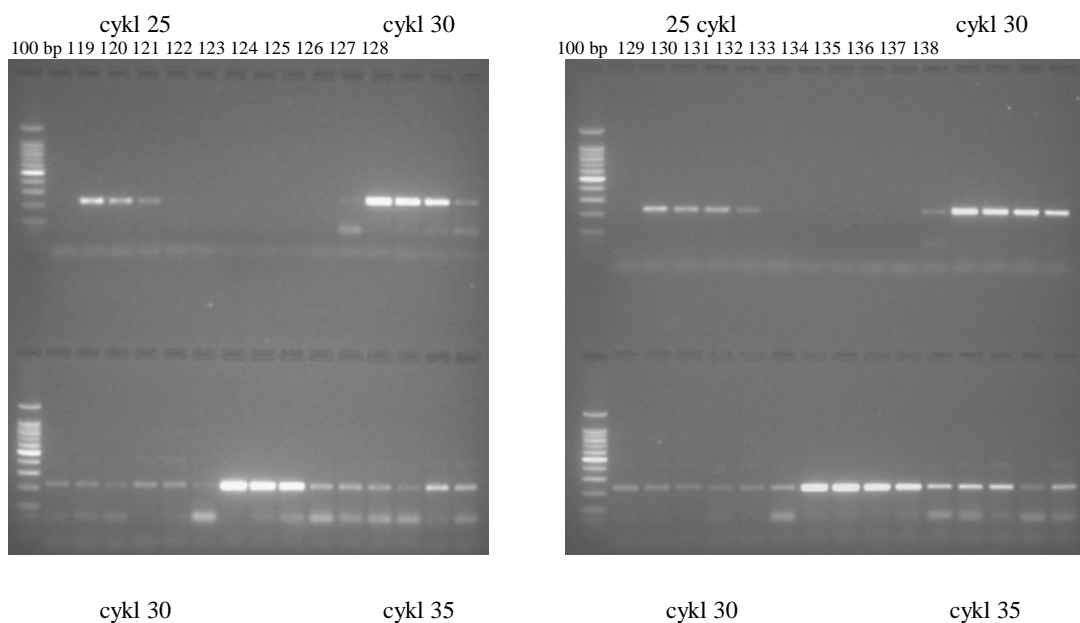
Fot. 43 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 119-138.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCRGAPDH (cykl 20-30), (119-128) WT, (129-138) MT.

Fot. 44 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (119-138).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność GAPDH
119	Kontrola	92,9
120	$0,5 \times 10^9$	93,6
121	$0,5 \times 10^8$	92,5
122	$0,5 \times 10^7$	92,7
123	$0,5 \times 10^6$	93,9
124	$0,5 \times 10^5$	93,6
125	$0,5 \times 10^4$	93,5
126	$0,5 \times 10^3$	94,0
127	$0,5 \times 10^2$	92,8
128	$0,5 \times 10^1$	93,7
129	Kontrola	84,9
130	$1,5 \times 10^9$	85,9
131	$1,5 \times 10^8$	87,5
132	$1,5 \times 10^7$	86,1
133	$1,5 \times 10^6$	87,5
134	$1,5 \times 10^5$	87,5
135	$1,5 \times 10^4$	89,4
136	$1,5 \times 10^3$	87,1
137	$1,5 \times 10^2$	88,5
138	$1,5 \times 10^1$	87,5

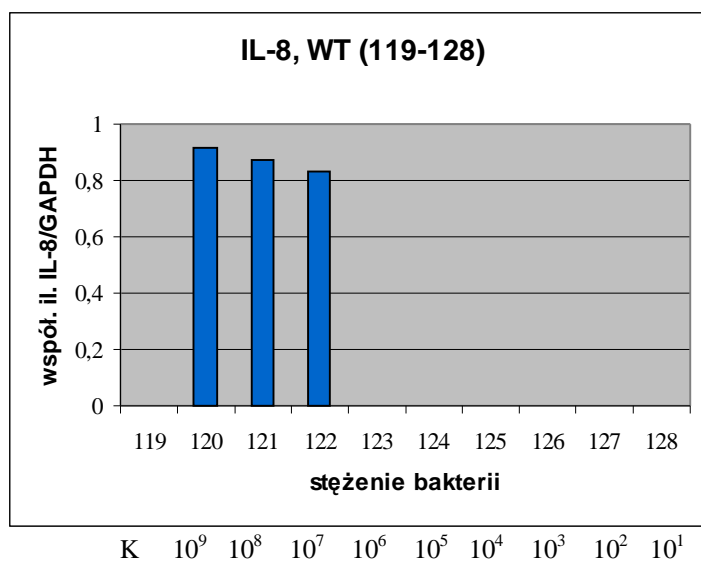
Tab. 40 Względna intensywność GAPDH (119-138).

IL-8 (cykl 25-35), 119- 128 WT, 129-138 MT

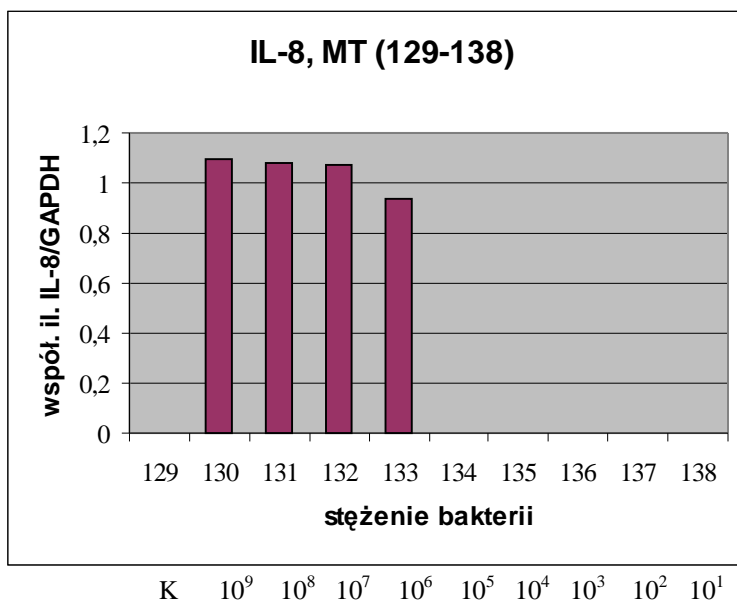
Fot. 45 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (119-138).

Tab. 41 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (119-138).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność IL-8 (25 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ. ilościowy IL-8/GAPDH
119	Kontrola	0	92,9	0
120	$0,5 \times 10^9$	85,5	93,6	0,913
121	$0,5 \times 10^8$	80,3	92,5	0,868
122	$0,5 \times 10^7$	77,0	92,7	0,830
123	$0,5 \times 10^6$	0	93,9	0
124	$0,5 \times 10^5$	0	93,6	0
125	$0,5 \times 10^4$	0	93,5	0
126	$0,5 \times 10^3$	0	94,0	0
127	$0,5 \times 10^2$	0	92,8	0
128	$0,5 \times 10^1$	0	93,7	0
129	Kontrola	0	84,9	0
130	$1,5 \times 10^9$	94,1	85,9	1,095
131	$1,5 \times 10^8$	94,5	87,5	1,08
132	$1,5 \times 10^7$	92,3	86,1	1,072
133	$1,5 \times 10^6$	81,9	87,5	0,936
134	$1,5 \times 10^5$	0	87,5	0
135	$1,5 \times 10^4$	0	89,4	0
136	$1,5 \times 10^3$	0	87,1	0
137	$1,5 \times 10^2$	0	88,5	0
138	$1,5 \times 10^1$	0	87,5	0

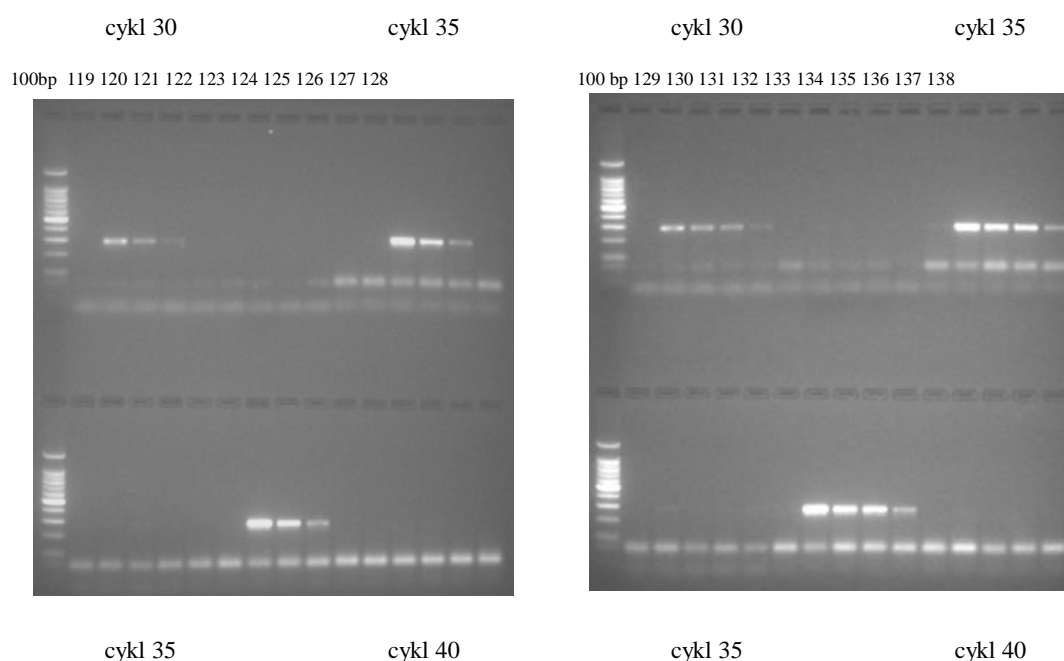


Ryc. 30 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych $10^9 - 10^1$ CFU/ml (119-128).



Ryc. 31 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych $10^9 - 10^1$ CFU/ml (129-138).

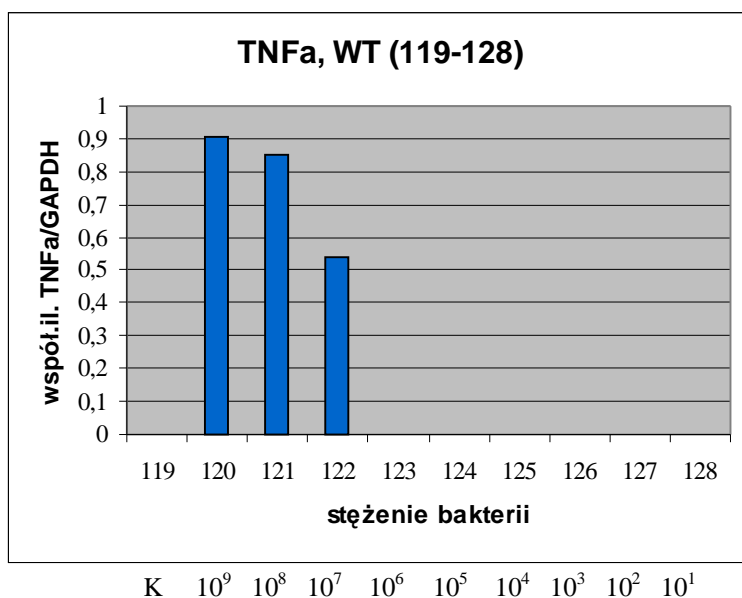
TNF- α (cykl 20-40) , 119- 128 WT, 129-138 MT



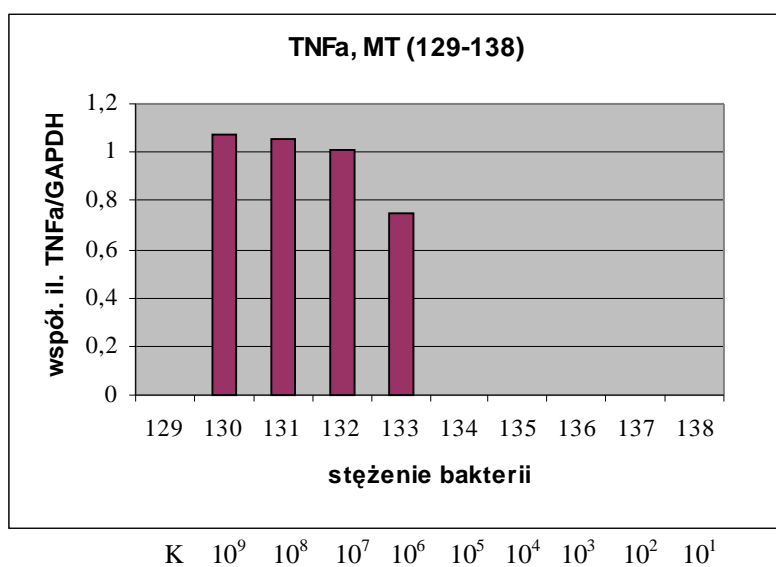
Fot. 46 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (119-138).

Tab. 42 Względna intensywność TNF- α . Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH (119-138).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność TNF- α (30 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ. ilościowy TNF- α /GAPDH
119	Kontrola	0	92,9	0
120	$0,5 \times 10^9$	84,7	93,6	0,904
121	$0,5 \times 10^8$	79,0	92,5	0,854
122	$0,5 \times 10^7$	50,1	92,7	0,540
123	$0,5 \times 10^6$	0	93,9	0
124	$0,5 \times 10^5$	0	93,6	0
125	$0,5 \times 10^4$	0	93,5	0
126	$0,5 \times 10^3$	0	94,0	0
127	$0,5 \times 10^2$	0	92,8	0
128	$0,5 \times 10^1$	0	93,7	0
129	Kontrola	0	84,9	0
130	$1,5 \times 10^9$	92,4	85,9	1,075
131	$1,5 \times 10^8$	92,4	87,5	1,056
132	$1,5 \times 10^7$	87,0	86,1	1,010
133	$1,5 \times 10^6$	65,2	87,5	0,745
134	$1,5 \times 10^5$	0	87,5	0
135	$1,5 \times 10^4$	0	89,4	0
136	$1,5 \times 10^3$	0	87,1	0
137	$1,5 \times 10^2$	0	88,5	0
138	$1,5 \times 10^1$	0	87,5	0



Ryc. 32 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128).



Ryc. 33 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus*, mutantem (MT 10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 (129-138).

Cytokiny	WT (119-128)	MT (129-138)
IL-8	$10^9, 10^8, 10^7$	$10^9, 10^8, 10^7, 10^6$
TNFa	$10^9, 10^8, 10^7$	$10^9, 10^8, 10^7, 10^6$

Tab. 43 Akumulacja cytokin: IL-8, TNFa w zależności stężenia kom. bakteryjnych WT i MT (119-138).

W komórkach Caco-2 w stadium 3-4 dni PC po inkubacji z gronkowcem złocistym, typem dzikim (WT, 119-128) i mutantem (MT, 129-138) o stężeniu 10^9-10^7 i 10^6 CFU/ml dla MT transkrypcja IL-8 i TNFa była bardzo szybka i prowadziła do szybkiej akumulacji mRNA, natomiast inkubacja o mniejszym stężeniu 10^5-10^1 CFU/ml dla MT i 10^6-10^1 nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

Izolacja RNA z komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml w stadium 3-4 dni PC) , 139- 148 WT, 149-158 MT.

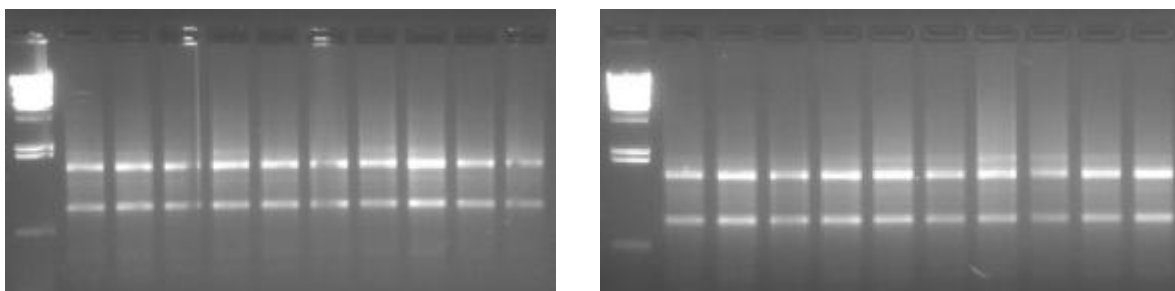
W celu uwiarygodnienia wyników powtórzono jeszcze raz eksperyment dotyczący akumulacji cytokin IL-8 i TNF α po inkubacji z *S.aureus* WT i MT.

Nr próbki	Stężenie bakterii	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$)
139	Kontrola	0,055	2,020	175,0
140	$1,5 \times 10^9$	0,072	1,967	229,0
141	$1,5 \times 10^8$	0,062	1,813	199,9
142	$1,5 \times 10^7$	0,065	1,924	206,9
143	$1,5 \times 10^6$	0,066	1,789	209,7
144	$1,5 \times 10^5$	0,061	1,943	195,2
145	$1,5 \times 10^4$	0,059	1,938	187,6
146	$1,5 \times 10^3$	0,093	1,809	298,1
147	$1,5 \times 10^2$	0,068	1,778	216,6
148	$1,5 \times 10^1$	0,064	1,828	203,8
149	Kontrola	0,071	1,831	228,0
150	2×10^9	0,107	1,601	342,4
151	2×10^8	0,069	1,800	221,0
152	2×10^7	0,079	1,762	254,2
153	2×10^6	0,081	1,802	260,2
154	2×10^5	0,055	1,807	176,6
155	2×10^4	0,092	1,748	295,7
156	2×10^3	0,067	1,604	215,0
157	2×10^2	0,079	1,654	252,1
158	2×10^1	0,096	1,720	307,6

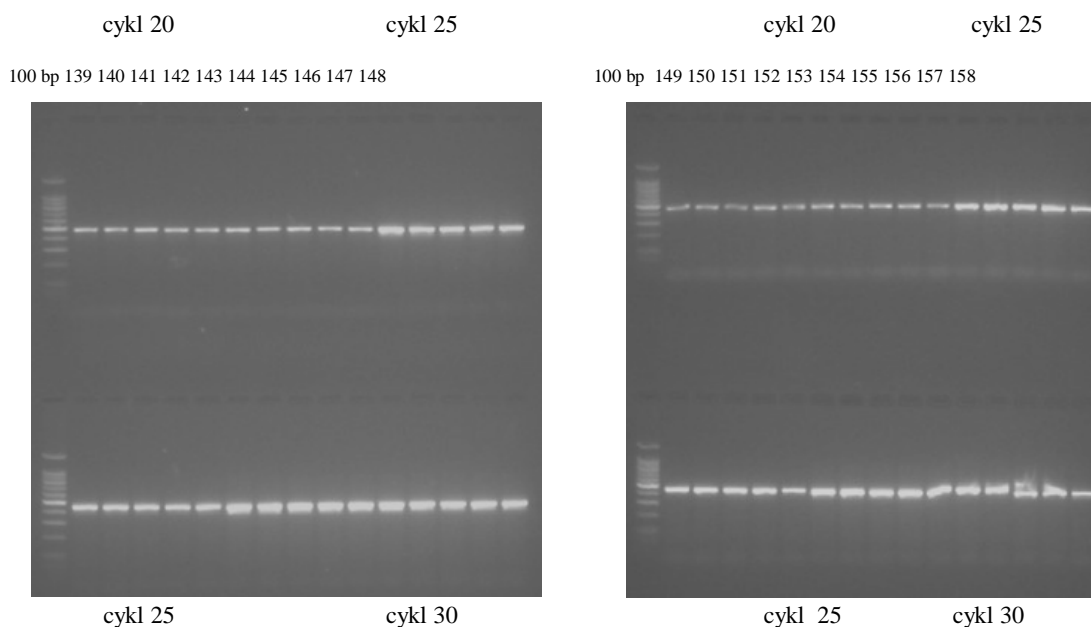
Tab. 44 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (139-158).

Elektroforeza RNA

λ /Hind III 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 λ /Hind III 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158



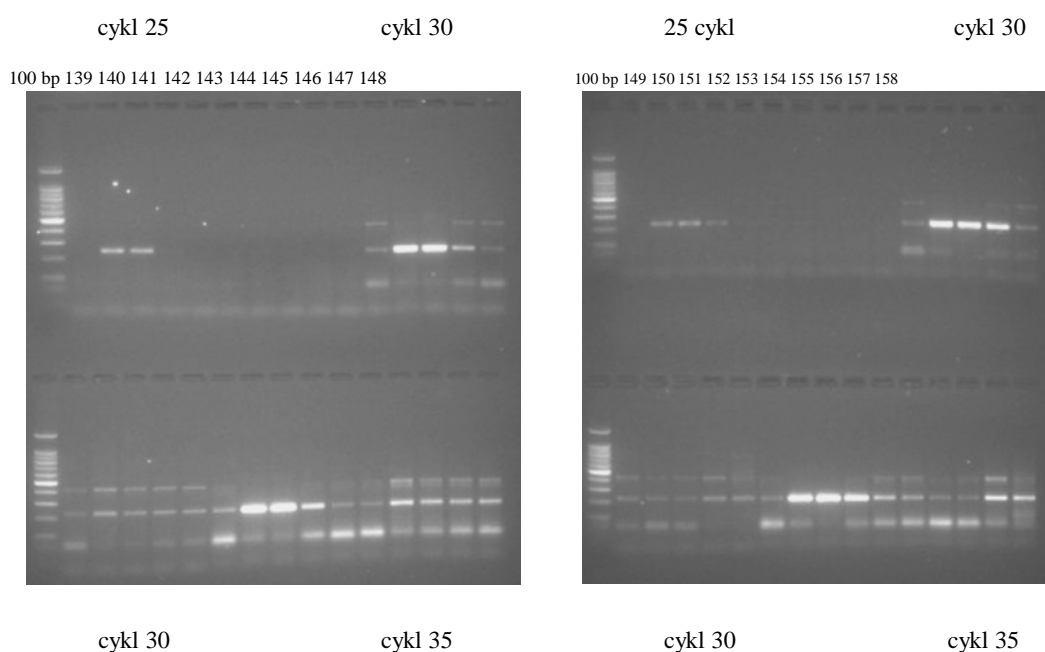
Fot. 47 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 139-158.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCRGAPDH (cykl 20-30), (139-148) WT, (149-158) MT.

Fot. 48 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (139-158).

Tab. 45 Względna intensywność GAPDH (139-158).

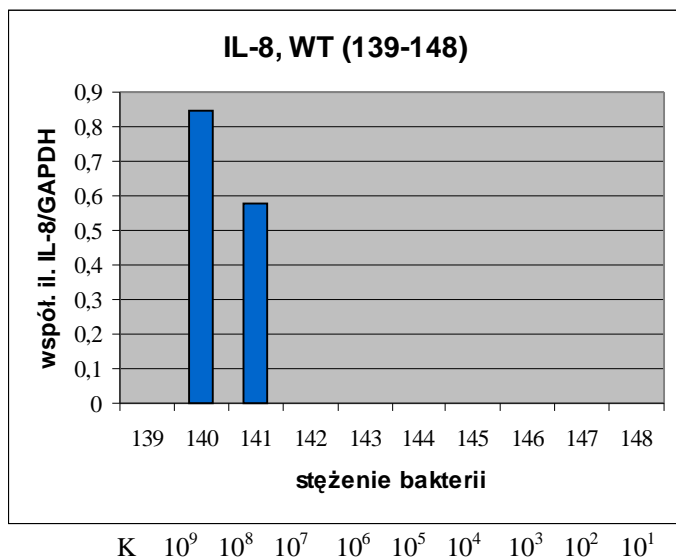
Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność GAPDH
139	Kontrola	143,3
140	$1,5 \times 10^9$	147,8
141	$1,5 \times 10^8$	182,7
142	$1,5 \times 10^7$	169,2
143	$1,5 \times 10^6$	156,6
144	$1,5 \times 10^5$	176,3
145	$1,5 \times 10^4$	147,8
146	$1,5 \times 10^3$	188,2
147	$1,5 \times 10^2$	161,7
148	$1,5 \times 10^1$	177,2
149	Kontrola	169,7
150	2×10^9	192,6
151	2×10^8	155,7
152	2×10^7	226,7
153	2×10^6	195,9
154	2×10^5	230,6
155	2×10^4	205,8
156	2×10^3	229,0
157	2×10^2	235,8
158	2×10^1	168,0

IL-8 (cykl 25-35), 139- 148 WT, 149-158 MT

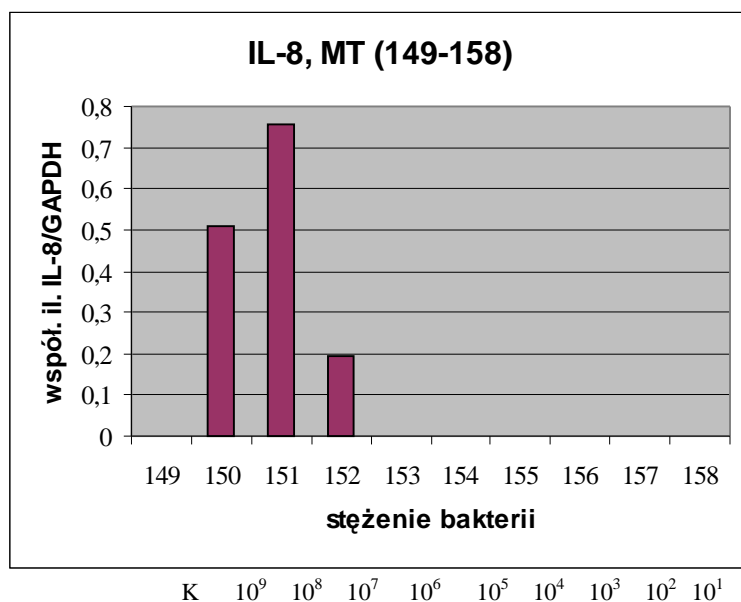
Fot. 49 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (139-158).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność IL-8 (25 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ. ilościowy IL-8/GAPDH
139	Kontrola	0	143,3	0
140	$1,5 \times 10^9$	125,0	147,8	0,846
141	$1,5 \times 10^8$	106,3	182,7	0,581
142	$1,5 \times 10^7$	0	169,2	0
143	$1,5 \times 10^6$	0	156,6	0
144	$1,5 \times 10^5$	0	176,3	0
145	$1,5 \times 10^4$	0	147,8	0
146	$1,5 \times 10^3$	0	188,2	0
147	$1,5 \times 10^2$	0	161,7	0
148	$1,5 \times 10^1$	0	177,2	0
149	Kontrola	0	169,7	0
150	2×10^9	98,4	192,6	0,510
151	2×10^8	117,9	155,7	0,757
152	2×10^7	43,6	226,7	0,192
153	2×10^6	0	195,9	0
154	2×10^5	0	230,6	0
155	2×10^4	0	205,8	0
156	2×10^3	0	229,0	0
157	2×10^2	0	235,8	0
158	2×10^1	0	168,0	0

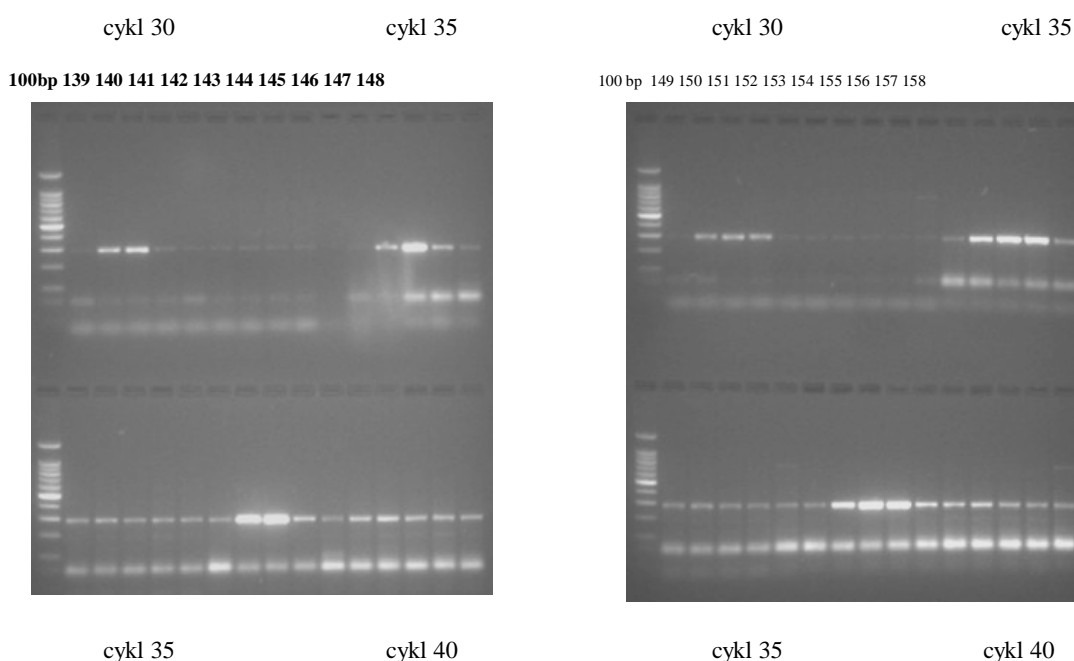
Tab. 46 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (139-158).



Ryc. 34 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych $10^9 - 10^1$ CFU/ml (139-148).



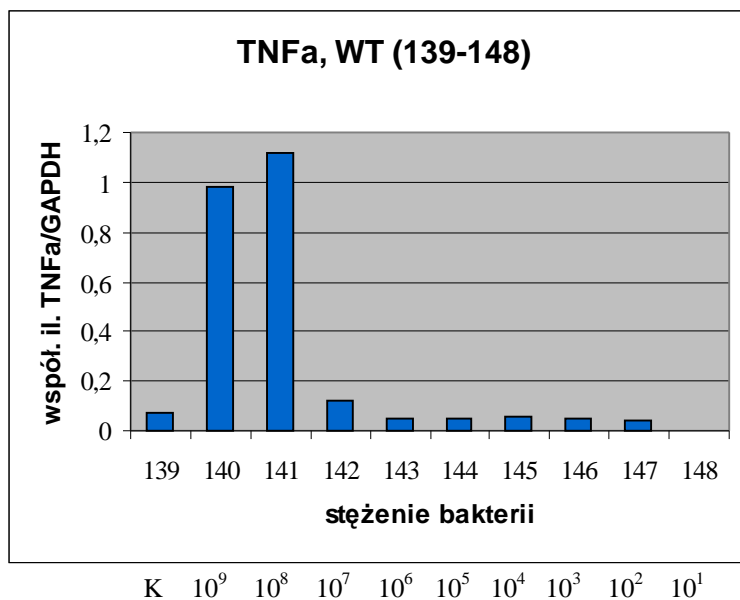
Ryc. 35 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych $10^9 - 10^1$ CFU/ml (149-158).

TNF- α (cykl 20-40) , 139- 148 WT, 149-158 MT

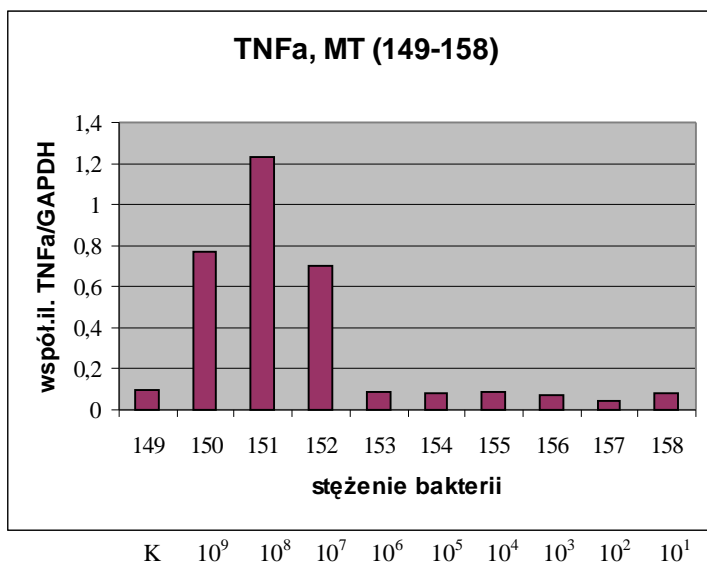
Fot. 50 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (139-158).

Nr próbki	Stężenie bakterii	Względna intensywność TNF- α (30 cykl)	Względna intensywność GAPDH	Współ.ilościowy TNF- α /GAPDH
139	Kontrola	11,1	143,3	0,07
140	$1,5 \times 10^9$	145,6	147,8	0,985
141	$1,5 \times 10^8$	204,1	182,7	1,117
142	$1,5 \times 10^7$	20,5	169,2	0,121
143	$1,5 \times 10^6$	7,5	156,6	0,048
144	$1,5 \times 10^5$	9,1	176,3	0,051
145	$1,5 \times 10^4$	8,6	147,8	0,058
146	$1,5 \times 10^3$	9,3	188,2	0,049
147	$1,5 \times 10^2$	7,8	161,7	0,044
148	$1,5 \times 10^1$	0	177,2	0
149	Kontrola	17,1	169,7	0,100
150	2×10^9	148,5	192,6	0,771
151	2×10^8	192,1	155,7	1,233
152	2×10^7	158,4	226,7	0,698
153	2×10^6	17,9	195,9	0,091
154	2×10^5	18,8	230,6	0,081
155	2×10^4	18,7	205,8	0,090
156	2×10^3	16,6	229,0	0,072
157	2×10^2	10,5	235,8	0,044
158	2×10^1	12,8	168,0	0,076

Tab. 47 Względna intensywność TNF- α . Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH. (139-158).



Ryc. 36 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (139-148).



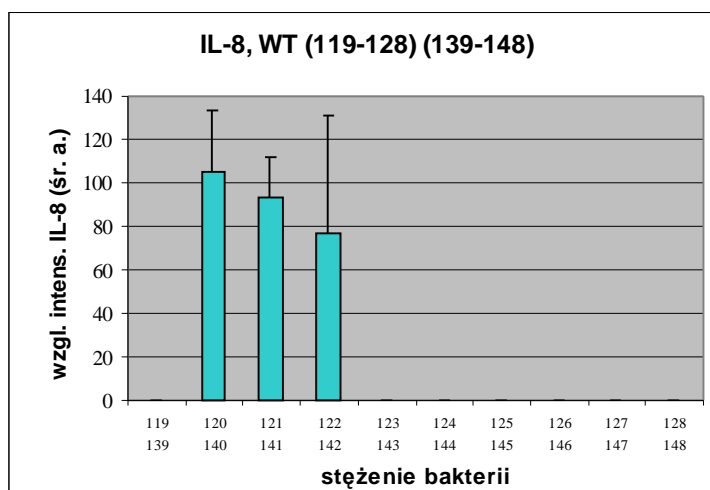
Ryc. 37 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (149-158).

Cytokiny	WT (139-148)	MT (149-158)
IL-8	$10^9, 10^8$	$10^9, 10^8, 10^7$
TNFa	$10^9, 10^8$	$10^9, 10^8, 10^7$

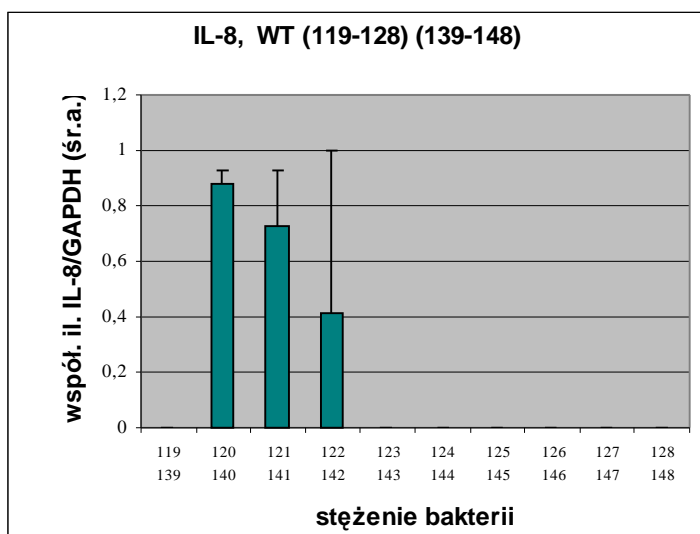
Tab. 48 Akumulacja cytokin: IL-8, TNFa w zależności stężenia kom. bakteryjnych WT i MT (139-158).

W komórkach Caco-2 w stadium 3-4 dni PC, po inkubacji z gronkowcem złocistym, typem dzikim (WT, 139-148) i mutantem (MT, 149-158) o stężeniu 10^9-10^8 i 10^7 CFU/ml MT transkrypcja IL-8 i TNFa była bardzo szybka i prowadziła do akumulacji mRNA, natomiast inkubacja o mniejszym stężeniu 10^6-10^1 CFU/ml dla MT i 10^7-10^1 dla WT nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

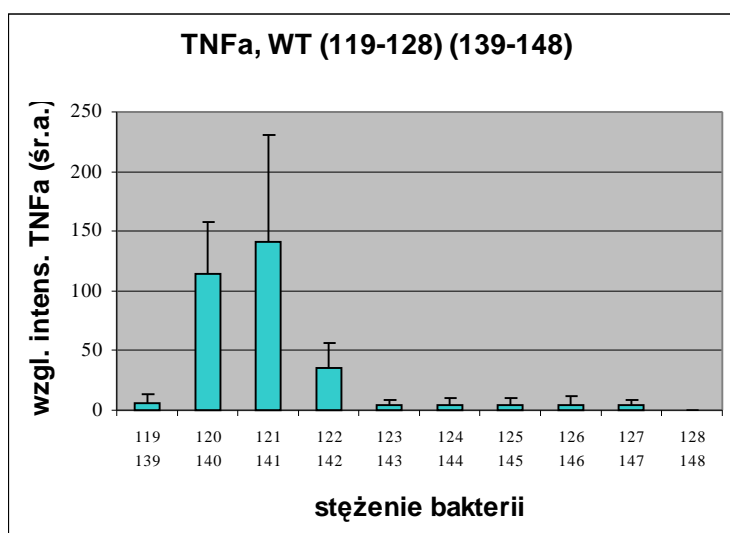
Zestawienie wyników: Ocena akumulacji transkryptów IL-8 i TNFa po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *S. aureus* typem dzikim WT (25923) oraz mutantem MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (119-138), (139-158).



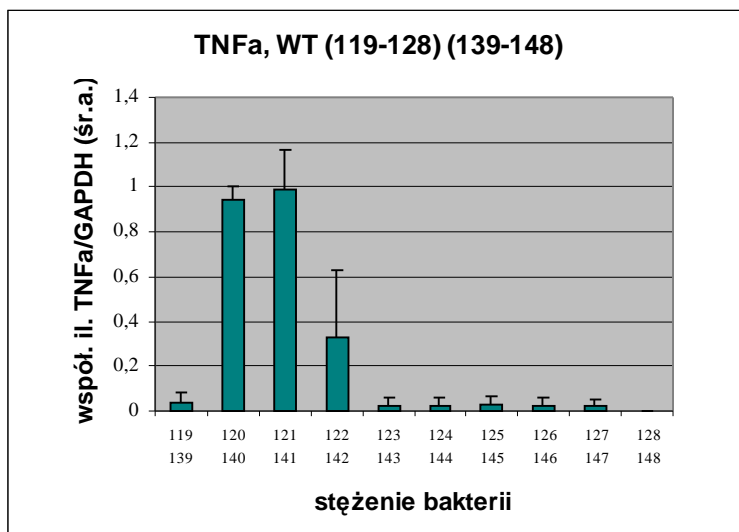
Ryc. 38 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9-10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).



Ryc. 39 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).

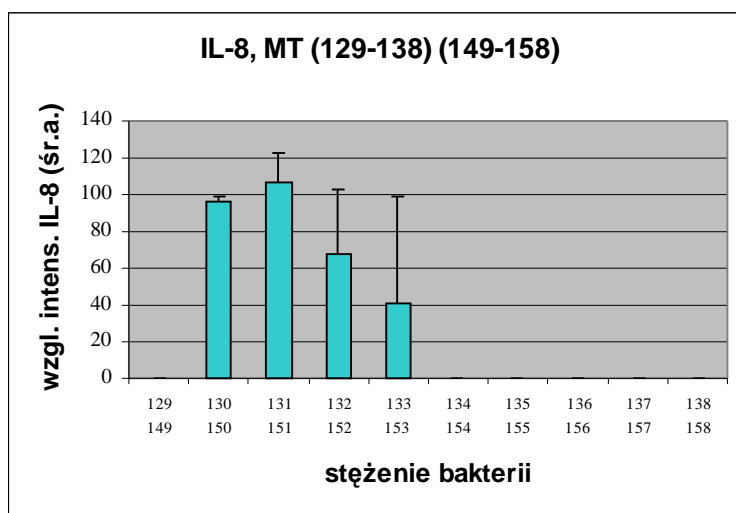


Ryc. 40 Średni przyrost transkryptu TNF α (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).

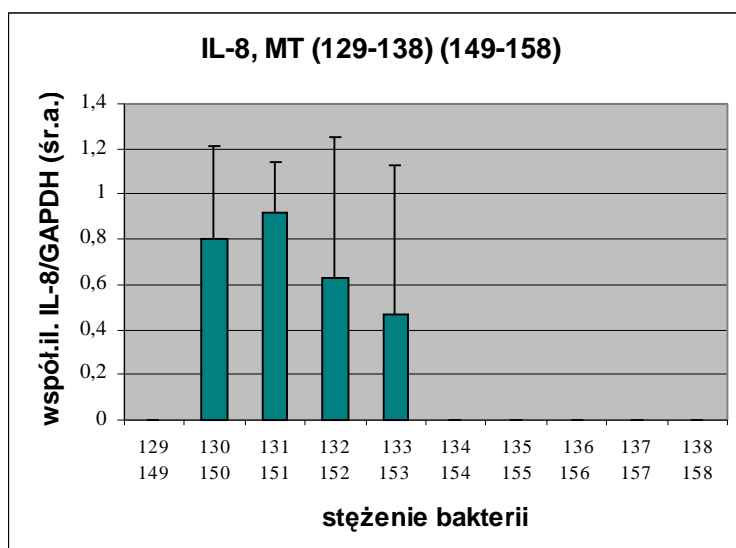


Ryc. 41 Średni przyrost transkryptu TNFα (współ. il. TNFα/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).

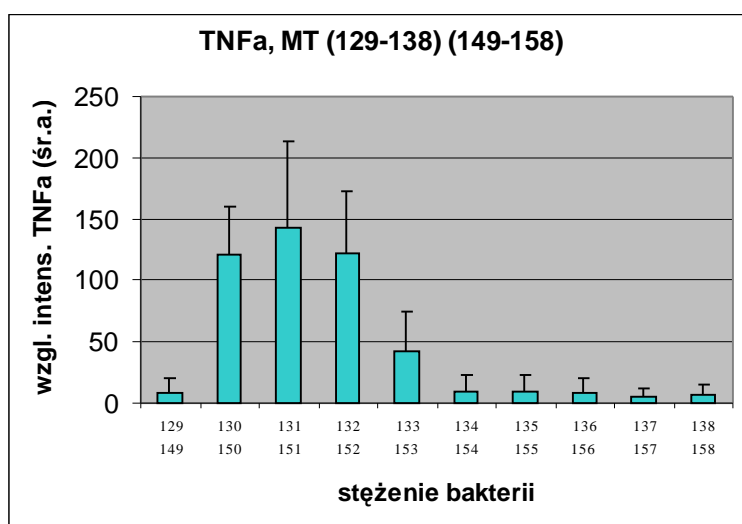
W komórkach Caco-2 w stadium 3-4 dni PC, po inkubacji z gronkowcem złocistym, typem dzikim WT, (119-128 oraz 139-148) o stężeniu 10^9 - 10^7 CFU/ml, wystąpił przyrost transkryptu IL-8 i TNFα. Inkubacja o mniejszym stężeniu 10^6 - 10^1 CFU/ml dla WT nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.



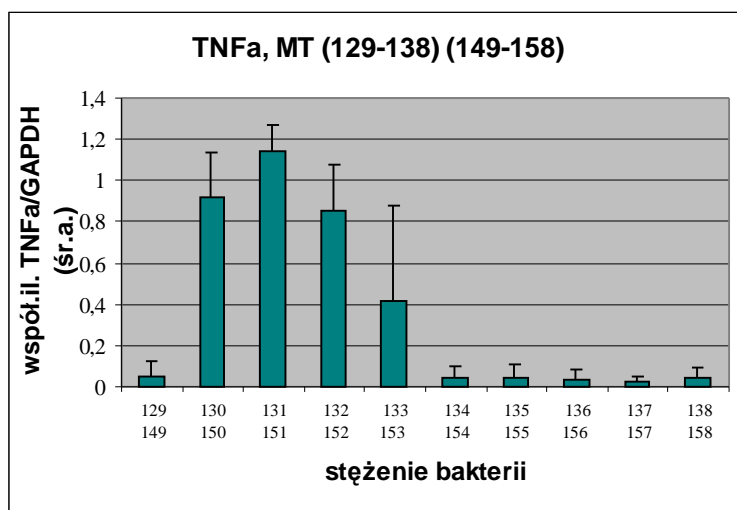
Ryc. 42 Średni przyrost transkryptu IL-8 (wzgl. intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).



Ryc. 43 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).



Ryc. 44 Średni przyrost transkryptu TNFa (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).



Ryc. 45 Średni przyrost transkryptu TNFα (współ.il. TNFα/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).

W komórkach Caco-2 w stadium 3-4 dni PC, po inkubacji z gronkowcem złocistym, mutantem MT, (129-138 oraz 149-158) o stężeniu 10^9 - 10^6 CFU/ml, wystąpił znaczny przyrost transkryptu IL-8 i TNFα. Inkubacja o mniejszym stężeniu 10^5 - 10^1 CFU/ml dla MT nie była wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji w komórkach.

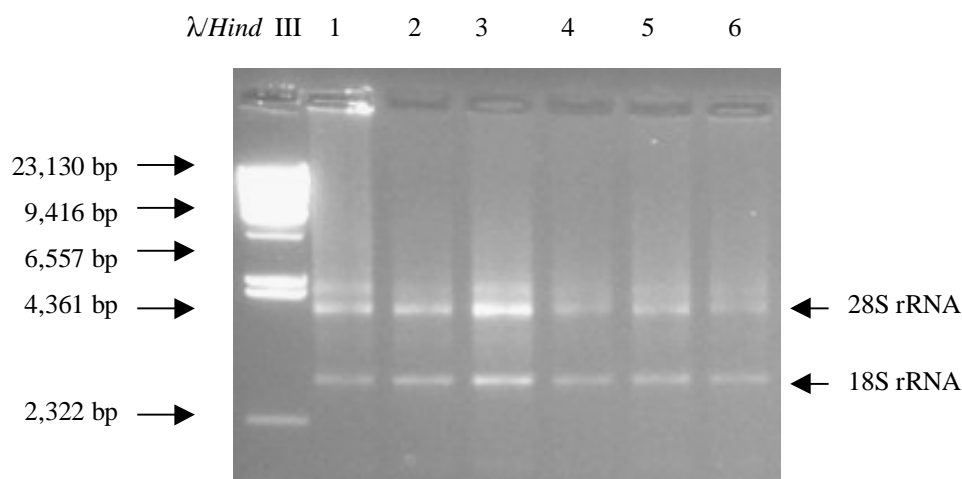
4.6 Ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus* 25923 – typem dzikim WT z ATCC w zależności od czasu trwania inkubacji.

Izolacja RNA z komórek Caco-2 (o gęstości: 5×10^5 kom./ml, 1×10^6 kom./ml, w stadium CC) (1-6) po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu $5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml. Czas trwania inkubacji: 1 i 3 godz.

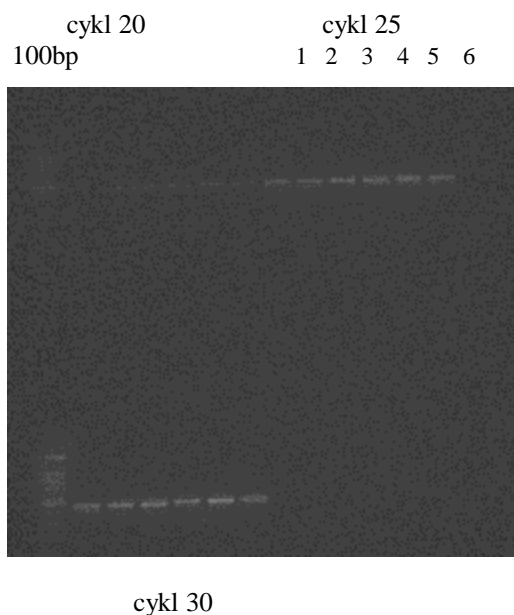
Nr próbki	Gęstość kom./ml	Czas inkubacji	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA (μg/ml)
1 (kontrola)	5×10^5	3 godz. bez kom.bakt.	0,054	1,947	173,1
2 (kontrola)	1×10^6		0,026	1,807	83,5
3	5×10^5	1 godz.	0,040	1,982	129,2
4	1×10^6	1 godz.	0,020	1,807	63,3
5	5×10^5	3 godz.	0,025	1,955	80,3
6	1×10^6	3 godz.	0,020	1,516	65,2

Tab. 49 Stężenie RNA (μg/ml) (1-6).

Elektroforeza RNA



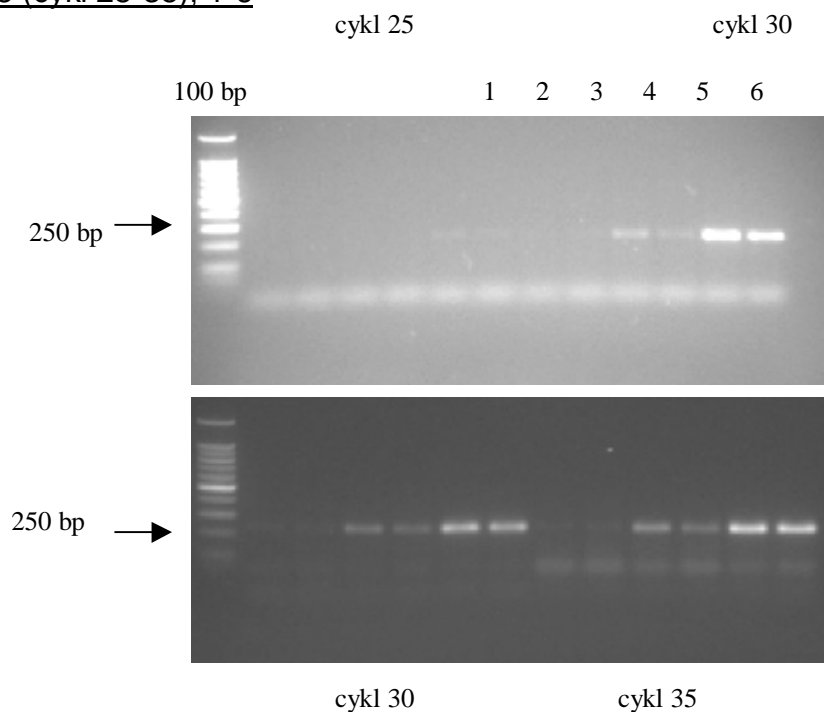
Fot. 51 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 1-6.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCRGAPDH (cykl 20-30), gen referencyjny, (1-6)

Fot. 52 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po 1 i 3 godz. inkubacji z gronkowcem złocistym, typem dzikim WT (1-6).

Nr próbki	Gęstość kom./ml	Czas inkubacji	Względna intensywność GAPDH
1 (kontrola)	5×10^5	3 godz. bez kom. bakt.	24,7
2 (kontrola)	1×10^6		32,4
3	5×10^5	1 godz.	44,4
4	1×10^6	1 godz.	45,2
5	5×10^5	3 godz.	52,8
6	1×10^6	3 godz.	40,8

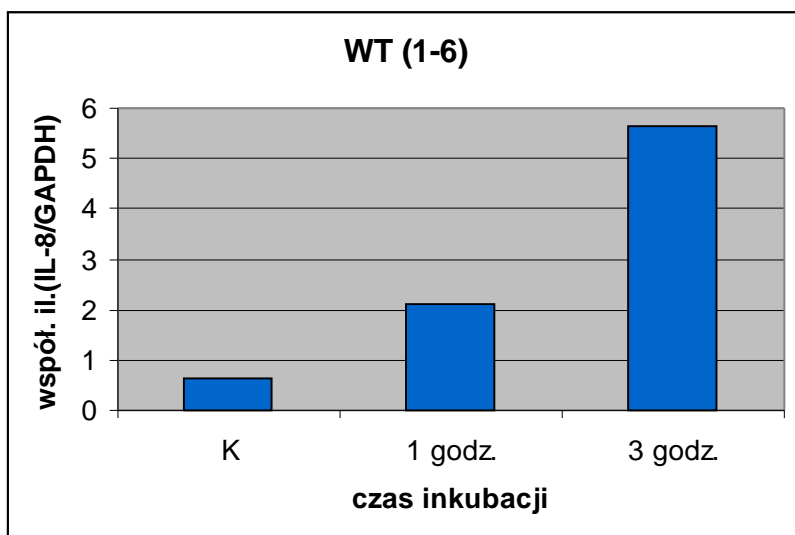
Tab. 50 Względna intensywność GAPDH (1-6).

IL-8 (cykl 25-35), 1-6

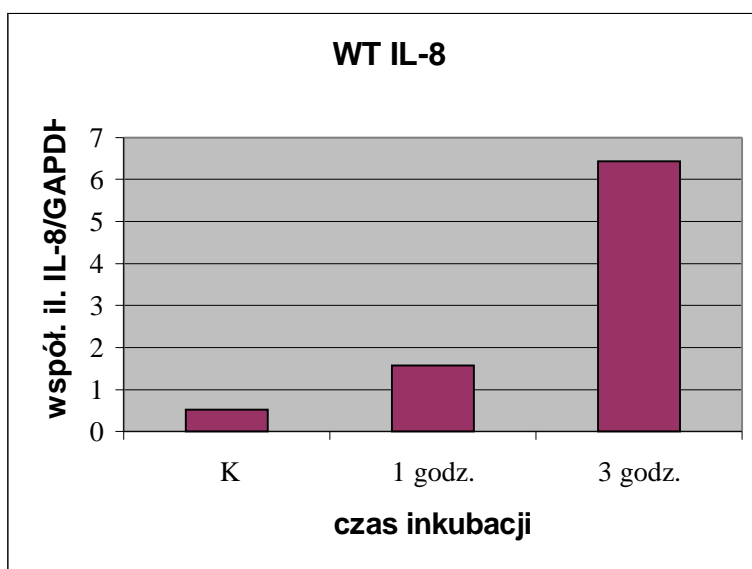
Fot. 53 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 Po inkubacji 1 i 3 godz. z gronkowcem złocistym WT (1-6).

Nr próbki	Gęstość kom./ml	Czas inkubacji	Względna intensywność IL-8	Względna intensywność GAPDH	Współczynnik ilościowy IL- 8/GAPDH
1 (K)	5×10^5	3 godz. bez	15,9	24,7	0,64
2 (K)	1×10^6	kom. bakt.	16,6	32,4	0,51
3	5×10^5	1 godz.	94,2	44,4	2,12
4	1×10^6	1 godz.	70,9	45,2	1,57
5	5×10^5	3 godz.	299,1	52,8	5,66
6	1×10^6	3 godz.	261,9	40,8	6,41

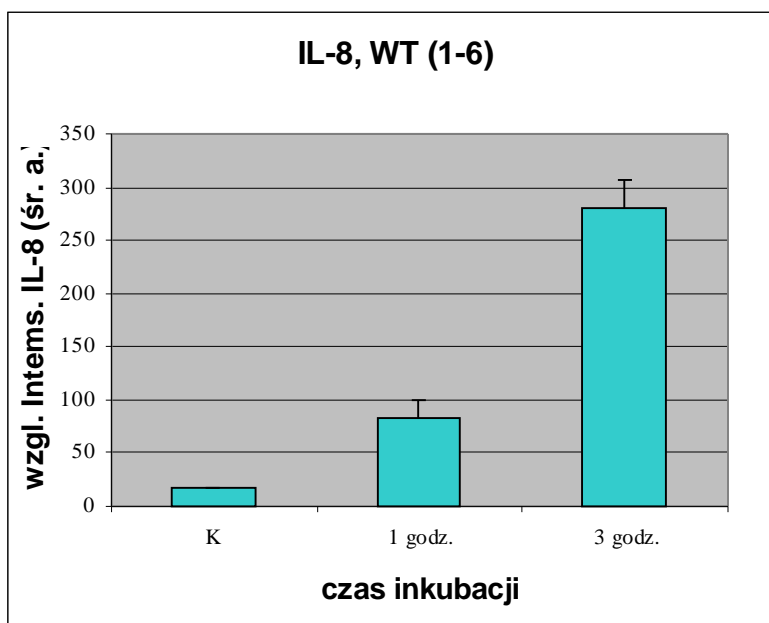
Tab. 51 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy (1-6).



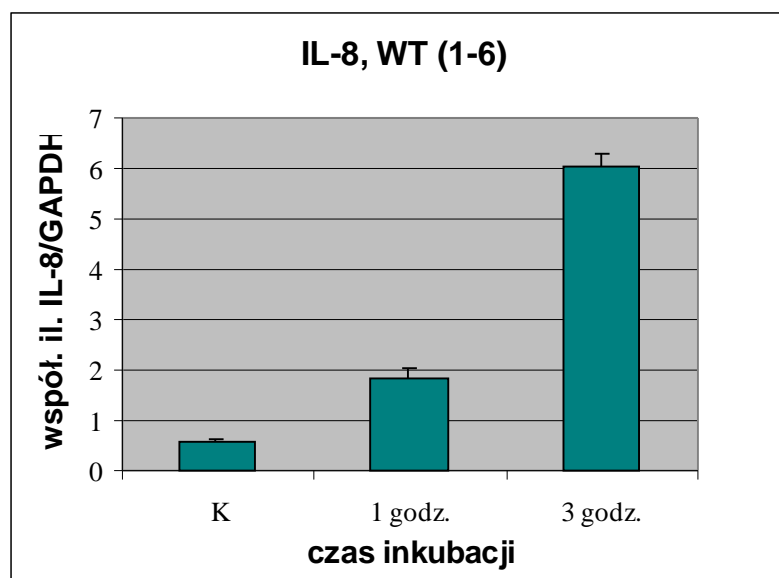
Ryc. 46 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (5×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus*, typem dzikim WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od czasu trwania inkubacji.



Ryc. 47 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (1×10^6 kom./ml) z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus*, typem dzikim WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji.



Ryc. 48 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (1×10^6 , 5×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji.



Ryc. 49 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 (1×10^6 , 5×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji.

Dzięki metodzie RT-PCR wykryto podstawowy poziom transkryptu cytokin : IL-8 i TNFa oraz zaobserwowano ich przyrost w komórkach stymulowanych w zależności od czasu trwania inkubacji.

Zarówno w komórkach Caco-2 o gęstości 5×10^5 kom./ml jak i 1×10^6 kom./ml, po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu $5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml transkrypcja genu IL-8 była bardzo szybka i prowadziła do szybkiej akumulacji mRNA.

Zaobserwowano znacznie wyższy przyrost transkryptu IL-8 po upływie 3 godz. niż po 1 godz. inkubacji.

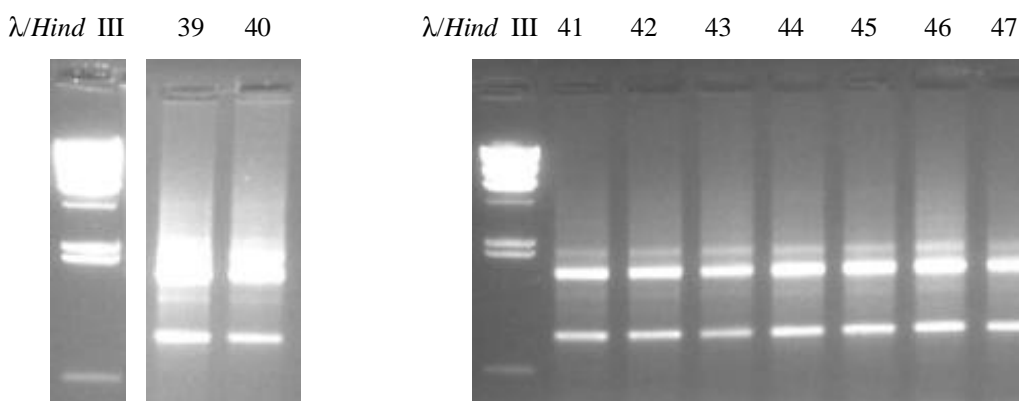
Izolacja RNA z komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml w stadium CC) (39, 41, 43, 45, 47); (40, 42, 44, 46) po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml.

Czas trwania inkubacji: 1, 2, 3 i 4 godz.

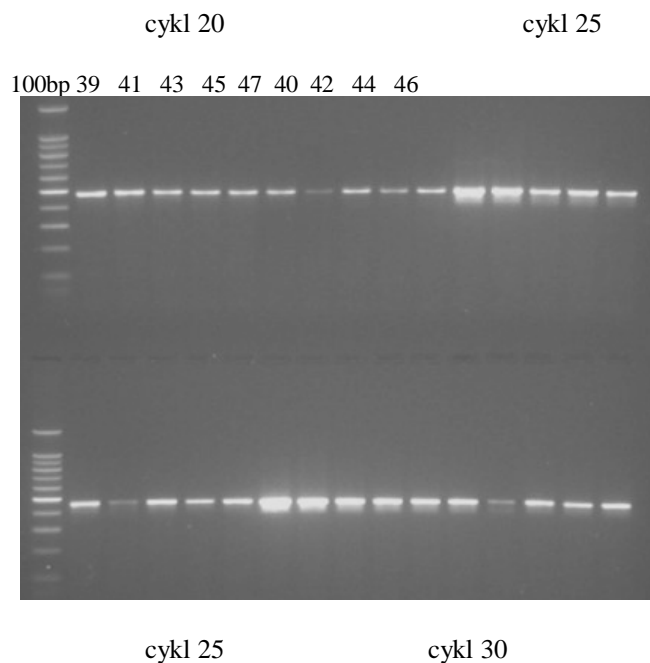
Nr próbki	Czas inkubacji	Absorbancja	Współczynnik ilościowy	Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$)
39 (kontrola)	3-4 godz. bez kom. bakt.	0,125	1,976	400,4
40 (kontrola)		0,117	1,967	375,6
41	1 godz.	0,134	1,979	428,5
42	1 godz.	0,110	1,950	353,1
43	2 godz.	0,115	1,972	368,1
44	2 godz.	0,132	1,968	420,9
45	3 godz.	0,133	1,961	426,5
46	3 godz.	0,122	1,953	389,4
47	4 godz.	0,095	1,958	303,6

Tab. 52 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (39-47).

Elektroforeza RNA



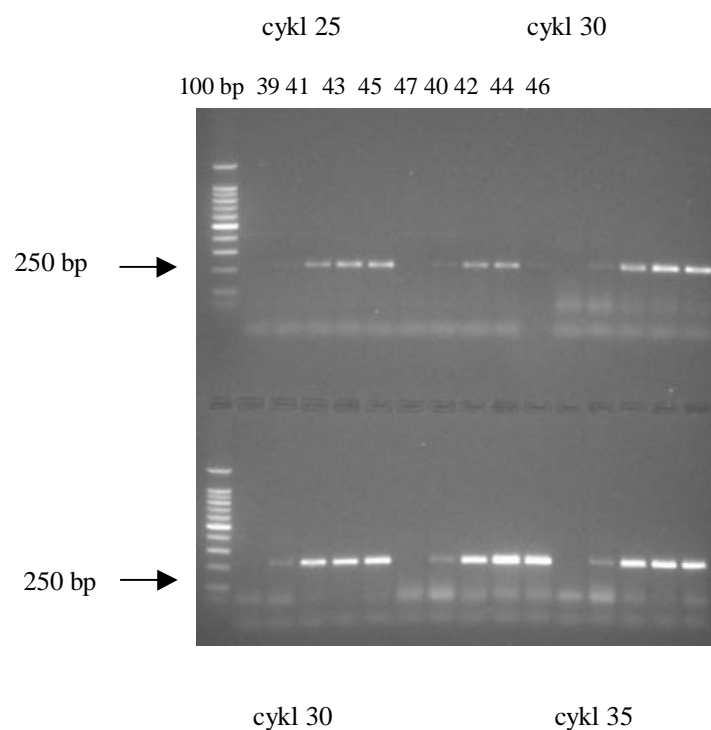
Fot. 54 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 39-47.

Elektroforetyczna analiza produktów półilościowego RT-PCRGAPDH (cykl 20-30), (39, 41, 43, 45, 47); (40, 42, 44, 46)

Fot. 55 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po 1 i 3 godz. inkubacji z gronkowcem złocistym WT (39-47, 40-46).

Nr próbki	Czas inkubacji	Względna intensywność GAPDH
39 (kontrola)	3-4 godz. bez kom.bakt.	128,0
41	1 godz.	127,1
43	2 godz.	102,4
45	3 godz.	95,7
47	4 godz.	87,7
40 (kontrola)	3-4 godz. bez kom. bakt.	76,6
42	1 godz	19,9
44	2 godz.	71,6
46	3 godz.	46,4

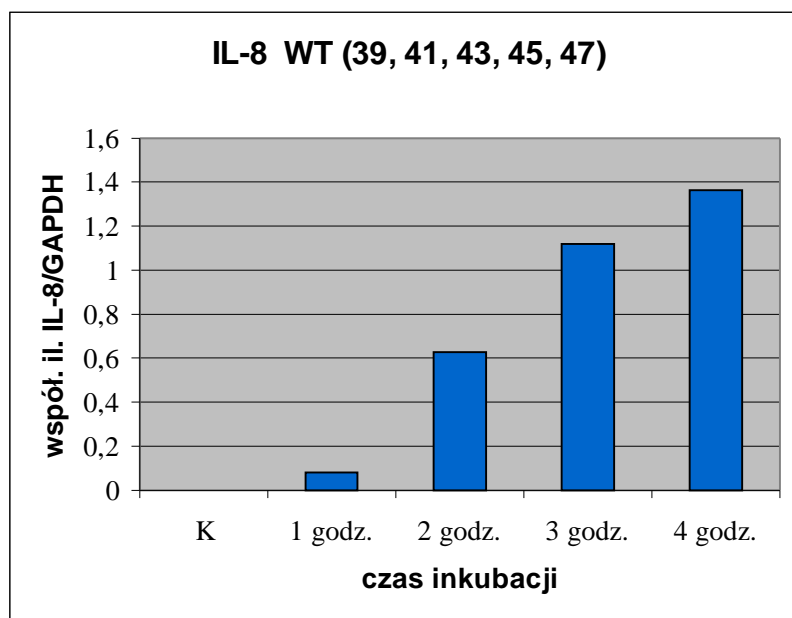
Tab. 53 Względna intensywność GAPDH (39-47).

IL-8 (cykl 25-35), (39, 41, 43, 45, 47); (40, 42, 44, 46)

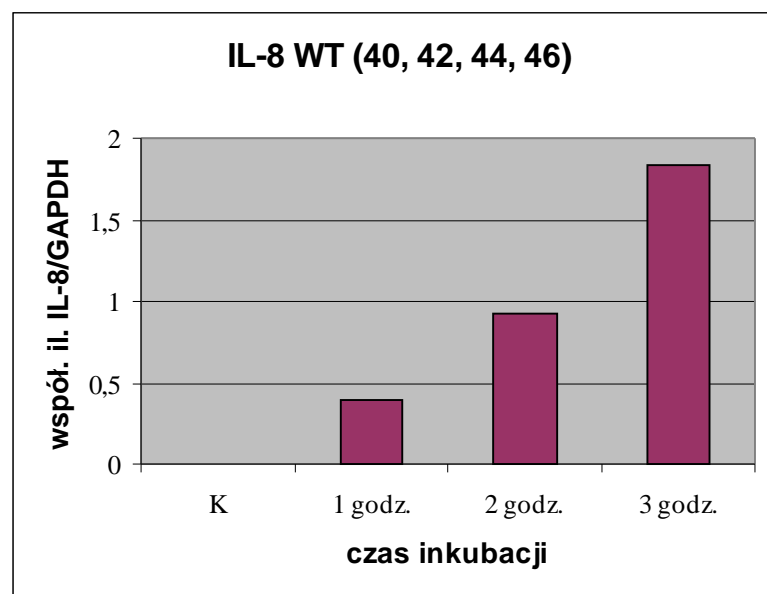
Fot. 56 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji 1 i 3 godz. z gronkowcem złocistym WT (39 - 47; 40 - 46).

Tab. 54 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (39-47).

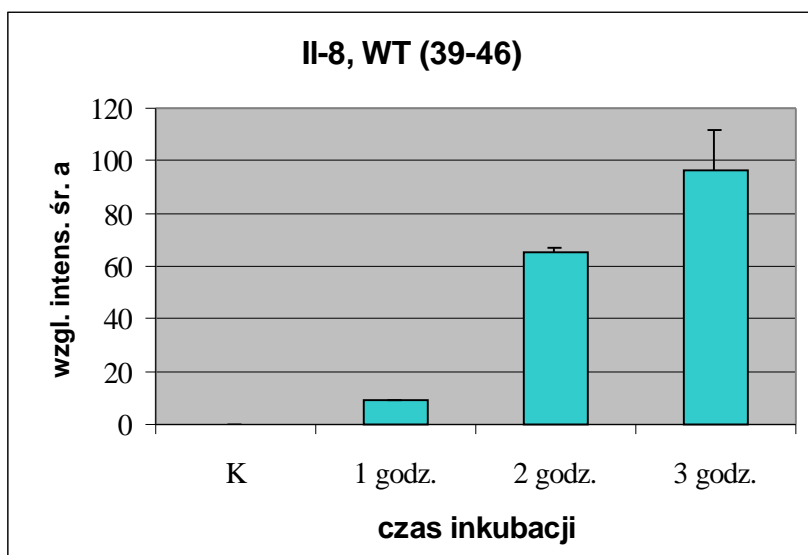
Nr próbki	Czas inkubacji	Wzgl. intens. IL-8	Wzgl. intens. GAPDH	Współ. ilościowy IL- 8/GAPDH
39 (K)	bez kom. bakt	0	128,0	0
41	1 godz.	9,8	127,1	0,08
43	2 godz.	64,7	102,4	0,63
45	3 godz.	107	95,7	1,12
47	4 godz.	119,6	87,7	1,36
40 (K)	bez kom. bakt.	0	76,6	0
42	1 godz.	7,7	19,9	0,39
44	2 godz.	66,2	71,6	0,92
46	3 godz.	85,6	46,4	1,84



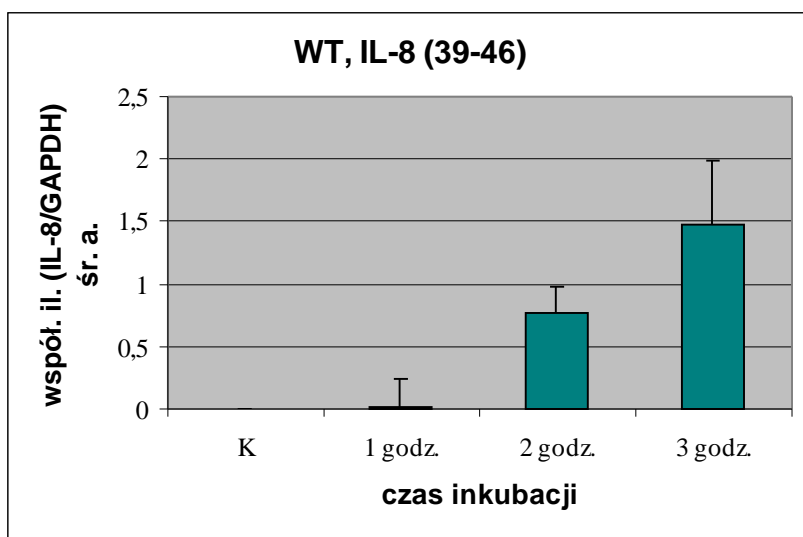
Ryc. 50 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2, 3 i 4 godz. inkubacji.



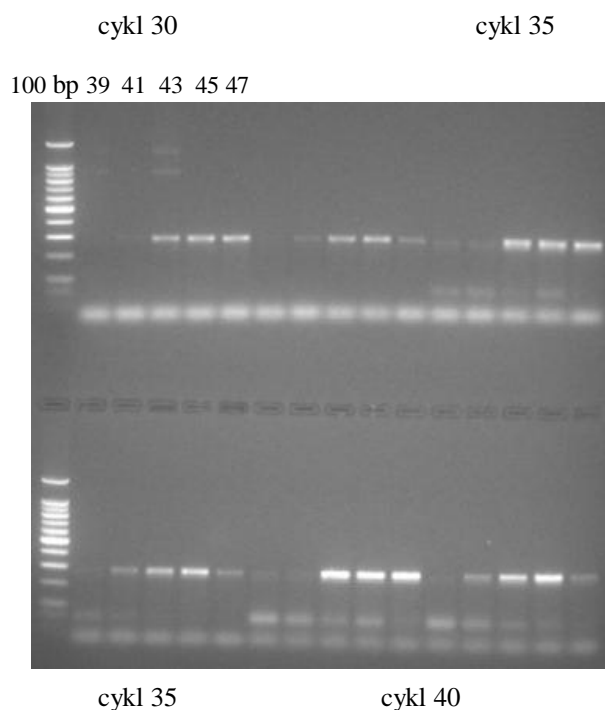
Ryc. 51 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji.



Ryc. 52 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (39-46).



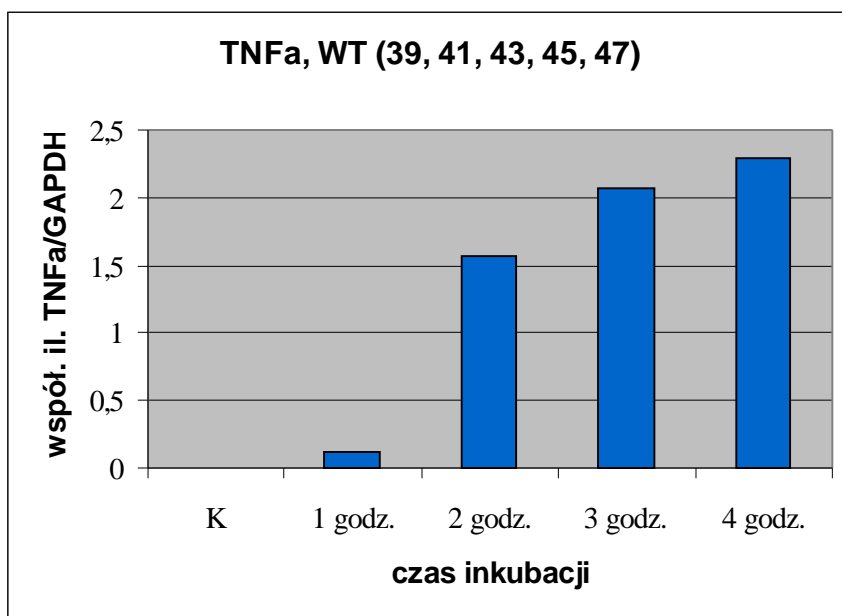
Ryc. 53 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il.) IL-8/GAPDH po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (39-46).

TNF α cykl (30-40), (39, 41, 43, 45, 47), (40, 42, 44, 46)

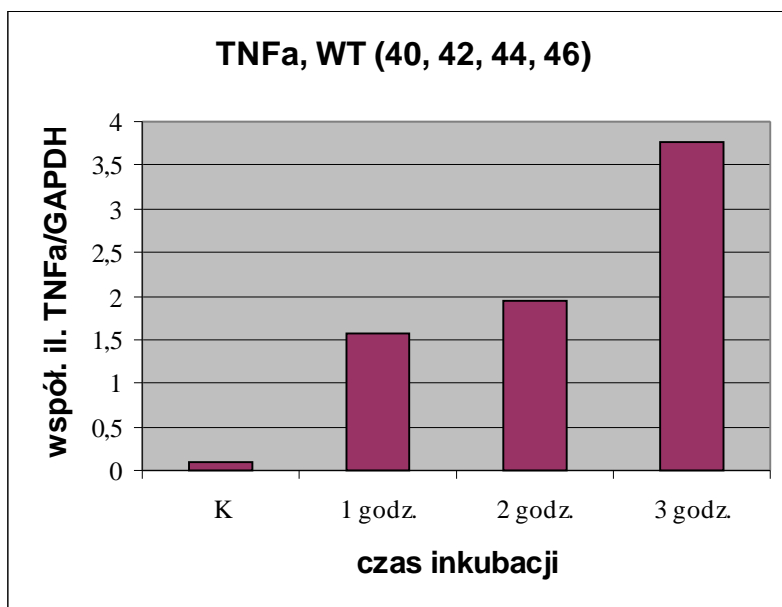
Fot. 57 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji 1, 2, 3, 4 godz. z gronkowcem złocistym WT (39, 41, 43, 45, 47) (40, 42, 44, 46).

Nr próbki	Czas inkubacji	Względna intensywność TNF α	Względna intensywność GAPDH	Współczynnik ilościowy TNF α /GAPDH
39 (K)	bez kom. bakt.	0	128,0	0
41	1 godz.	13,8	127,1	0,12
43	2 godz.	160,4	102,4	1,57
45	3 godz.	198,4	95,7	2,07
47	4 godz.	201,3	87,7	2,29
40 (K)	bez kom. bakt.	7,8	76,6	0,10
42	1 godz.	31,4	19,9	1,57
44	2 godz.	138,4	71,6	1,93
46	3 godz.	174,8	46,4	3,77

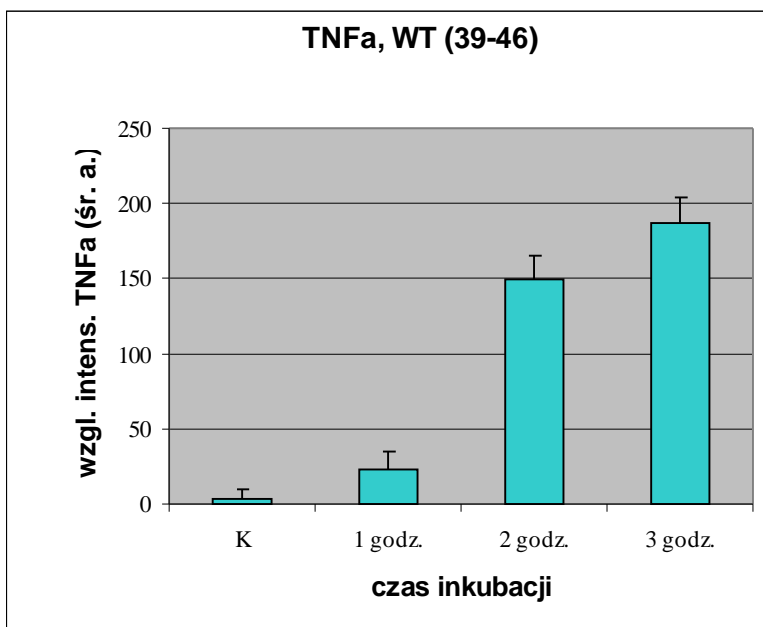
Tab. 55 Względna intensywność. Współczynnik ilościowy TNF- α (39-47).



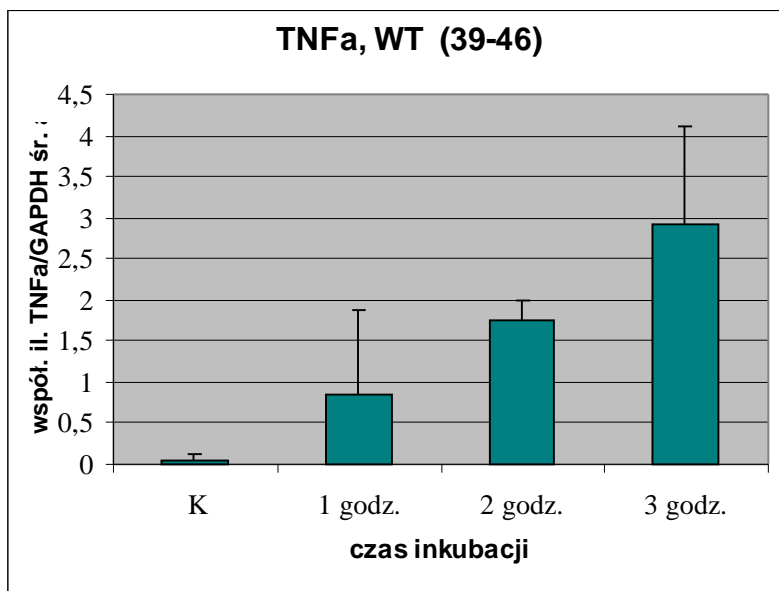
Ryc. 54 Przyrost transkryptu TNFα po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2, 3, 4 godz. inkubacji (39-47).



Ryc. 55 Przyrost transkryptu TNFα po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (40-46).



Ryc. 56 Średni przyrost transkryptu TNFα po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (39-46).



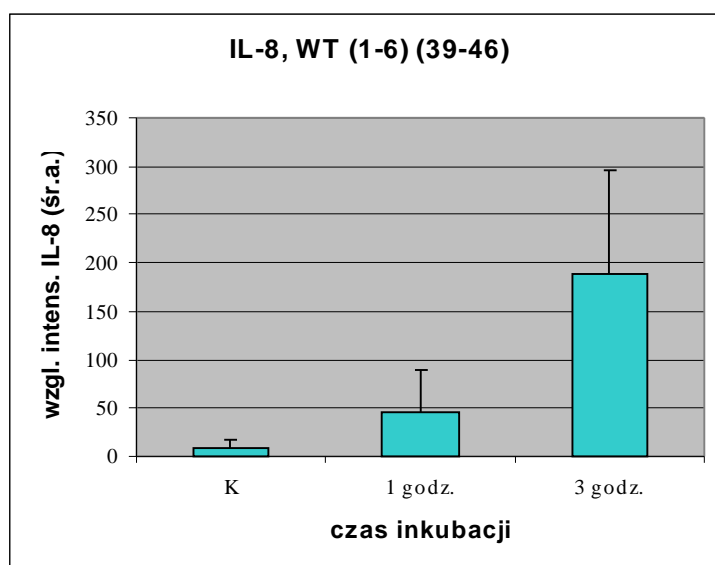
Ryc. 57 Średni przyrost transkryptu TNFα po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (39-46).

Zaobserwowano przyrost transkryptu TNFa w komórkach stymulowanych w zależności od czasu inkubacji.

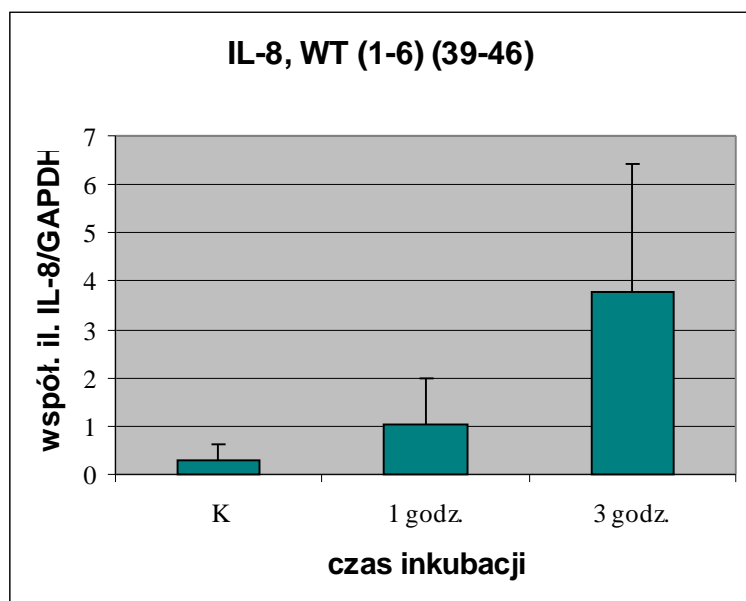
W komórkach Caco-2 (2×10^5 kom./ml) po 1, 2, 3 i 4 godz. inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml transkrypcja IL-8 i TNFa po była bardzo szybka i prowadziła do akumulacji mRNA. Zaobserwowano najwyższy przyrost transkryptów po upływie 4 godz. i najniższy po 1 godz. inkubacji, ponadto po upływie 2 godz. wystąpił znaczny przyrost transkryptu TNFa w porównaniu z 1 godz. inkubacji.

Dla IL-8 i TNF-a transkrypcja była znacznie szybsza po upływie 3 godz w porównaniu z 1 godz. po inkubacji z gronkowcem WT.

Zestawienie wyników: Ocena akumulacji transkryptów IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym *Staphylococcus aureus* 25923 – typem dzikim WT z ATCC w zależności od czasu trwania inkubacji : 1, 2, 3, 4 godz. (1-6); (39, 41, 43, 45, 47); (40, 42, 44, 46).



Ryc. 58 Średni przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml, $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji (1-6) (39-46).



Ryc. 59 Średni przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml, $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji (1-6) (39-46).

W komórkach Caco-2 o gęstości 5×10^5 , 1×10^6 kom./ml oraz 2×10^5 kom./ml po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu $5,5 \times 10^{12}$ i $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml wykryto podstawowy poziom transkryptu IL-8 i zaobserwowano jego przyrost po 1 i 3 godz. inkubacji. Poziom transkryptu IL-8 jest znacznie wyższy po 3 godz. inkubacji niż po 1 godz.

Zaprojektowane w/w doświadczenia dotyczące oceny akumulacji transkryptów cytokin IL-8 i TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z *S. aureus* WT i MT w zależności od stężenia komórek bakteryjnych i czasu trwania inkubacji stanowią część standaryzacji metody.

4.7 Selekcja szczepów klinicznych

Zanim rozpoczęto badania nad możliwością wystąpienia translokacji szczepów klinicznych dokonano ich selekcji w celu znalezienia źródła zakażenia uogólnionego (sepsy).

Pod uwagę wzięto dwa źródła: ranę i potencjalny rezerwuuar gronkowca – przewód pokarmowy.

Etapem wstępnym do selekcji szczepów klinicznych od chorych po urazie termicznym była izolacja gronkowca (MRSA, MSSA, MRSE, MSSE, SH) z trzech materiałów : z rany, krwi i głębokiego wymazu z odbytu.

Głęboki wymaz z odbytu był jedyną możliwą formą pobrania materiału z przewodu pokarmowego chorego po bardzo rozległym urazie termicznym. Okazało się, że zarówno liczba pobrań jak i częstość izolacji gronkowca z tego materiału była bardzo niewielka. Najwięcej wyizolowanego gronkowca otrzymano z rany, następnie z krwi i najmniej z odbytu.

Po izolacji gronkowców od pacjentów otrzymano następujące układy (lub pary) szczepów pochodzących z rany (R), krwi (K) i odbytu (O) od jednego pacjenta: O-K, R-O-K, O-R, R-K, R, K.

Następnie po analizie fenotypowej i genotypowej szczepów dokonano selekcji szczepów klinicznych. Do translokacji hipotetycznie może dochodzić, gdy szczepy pochodzące z odbytu oraz z krwi są identyczne pod względem genotypowym (to jest optymalne rozwiązanie) oraz gdy szczepy pochodzące z krwi i rany różnią się genotypowo.

Ta różnica jest wskazówką, do stwierdzenia, że do zakażenia uogólnionego doszło nie w wyniku kontaminacji czy zakażenia rany oparzeniowej, ale z innego źródła, np. z przewodu pokarmowego.

Po selekcji genotypowej otrzymano następujące układy wykorzystane do dalszych badań: O=K – gdzie, szczep pochodzący z odbytu był identyczny pod względem genotypowym ze szczepem z krwi (najlepszy układ do zbadania), R=K=O - gdzie ten sam szczep jest w trzech różnych materiałach, R=K≠O i R≠O≠K, gdzie szczep pochodzący z odbytu różnił się genotypowo od szczepu pochodzącego z krwi oraz O≠R – gdzie szczep z rany i odbytu były ze sobą niespokrewnione.

Następnie wzięto pod uwagę szczepy pochodzące z krwi i rany, które były identyczne pod względem genotypowym K=R (K_i) lub były różne K≠R (K_r).

Identyczność genotypowa szczepów pochodzących z krwi i rany potwierdzałaby hipotezę, że do sepsy dochodzi poprzez kontaminację lub zakażenie rany oparzeniowej, natomiast różnice szczepów we wzorze restrykcyjnym PFGE, świadczyłyby o innym źródle zakażenia uogólnionego.

Szczepy wyizolowane z rany i krwi i odbytu				
1)O=K 2)R=O=K	3) R=K¹O 4)R¹K¹O	5) O¹ R	6) R¹K	7) R=K
1) 1-2	3) 74-72-73	5) 29-30	3-4	6-5
2) 58-59-60	4) 75-71-73		7-8	14-12
			18-17	19-20
			43-42	25-26
			62-61	47-48
			64-63	54-53
				79-78

Tab. 56 Analiza genotypowa szczepów klinicznych pochodzących z rany, krwi i odbytu. Wyodrębniono cztery grupy szczepów klinicznych, które wykorzystano w badaniu adherencji, inwazji i translokacji bakteryjnej.

O	K_r (K¹R)	R	K_i (K=R)
1	4	3	5
59	8	7	12
73	42	58	20
29	17		26
	61		48
	63		53
	72		78
			60

Tab. 57 Szczepy kliniczne wyselekcjonowane do dalszych badań.

4.8 Wyniki działania bakteriobójczego gentamycyny i lisostafiny na wyselekcjonowane 22 szczepy kliniczne

Do badań użyto szczególnie odporne szczepy kliniczne *S. aureus*. Przeprowadzono test, który miał na celu wyselekcjonowanie szczepów, które byłyby: wrażliwe na gentamycynę (100 µg/ml) oraz lisostafinę (20 µg/ml).

	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	7 (R) R¹K MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA
+ gent. (2 godz.)	0	za dużo kolonii	562	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ gent. (4 godz.)	0	za dużo kolonii	202	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ lys. (1 godz.)	0	0	0	0	za dużo kolonii	0

	12 (K_i) K=R MRSA	17 (K_r) K¹R MRSA	20 (K_i) K=R MRSA	26 (K_i) K=R MRSA	29 (O) O¹R	42 (K_r) K¹R MRSA
+ gent. (2 godz.)	0	223	0	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ gent. (4 godz.)	0	12	0	1000	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ lys. (1 godz.)	0	za dużo kolonii	0	0	za dużo kolonii	0

	48 (K_i) K=R MRSA	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=O=K MRSA	59 (O) R=O=K MRSA	60 (K_i) K=R MRSA	61 (K_r) K¹R MRSA
+ gent. (2 godz.)	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii	1200
+ gent. (4 godz.)	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ lys. (1 godz.)	0	0	0	0	88	za dużo kolonii

	63 (K_r) K¹R MRSA	72 K_i, R=K, K¹O MRSA	73 (O) K¹O MRSA	78 MRSA (K_i) K=R
+ gent. (2 godz.)	za dużo kolonii	1200	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ gent. (4 godz.)	za dużo kolonii	150	za dużo kolonii	za dużo kolonii
+ lys. (1 godz.)	0	0	za dużo kolonii	0

Tab. 58 Ilość koloni gronkowców po inkubacji z gentamycyną (100 µg/ml) i lisostafiną (20 µg/ml).

Stężenie początkowe wybranych szczepów (4, 12, 53):

Ilość kolonii „4” przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 1 kolonia, „4” = 5×10^8 CFU/ml

10^{-7} – 3 kolonie, „4” = $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

Ilość kolonii „12” przy rozcieńczeniu 10^{-6} – 6 kolonii, „12” = 3×10^7 CFU/ml

Ilość kolonii „53” przy rozcieńczeniu 10^{-5} – 9 kolonii, S1400 = $4,5 \times 10^6$ CFU/ml

	4 (K _r) K ¹ R MRSA	17 (K _r) K ¹ R MRSA	26 (K _i) K=R MRSA	60 (K _i) K=R MRSA	61 (K _r) K ¹ R MRSA	72 (K _r) K ¹ R MRSA
+ gent. (2 godz.)	$5,62 \times 10^3$	$2,23 \times 10^3$	za dużo kolonii	za dużo kolonii	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
+ gent. (4 godz.)	$2,02 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	1×10^4	za dużo kolonii	za dużo kolonii	$1,5 \times 10^3$
+ lys. (1 godz.)	0	za dużo kolonii	0	$8,8 \times 10^2$	za dużo kolonii	0

Tab. 59 Stężenie końcowe gronkowców (CFU/ml).

	Wrażliwe na gent. i lys.	Oporne na gent. i lys.	Wrażliwe na lys. i oporne na gent.
Numery szczepów	1, 12, 20	7, 17, 29, 60, 61, 73	3, 4, 5, 8, 26, 42, 48, 53, 58, 59, 63, 72, 78

Tab. 60 Wrażliwość i oporność szczepów klinicznych na gentamycynę i lisostafinę.

Wrażliwe na gentamycynę i lisostafinę było 13,6% wyselekcjonowanych szczepów klinicznych (1, 12, 20). Oporne na gentamycynę i lisostafinę było 27,3% szczepów (7, 17, 29, 60, 61, 73). Wrażliwe na lisostafinę i oporne na gentamycynę było 59,1% szczepów (3, 4, 5, 8, 26, 42, 48, 53, 58, 59, 63, 72, 78).

73 O (R≠O≠K)



Fot. 58 Stężenie końcowe szczepu nr 73 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 73 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i lisostafiną ($20\mu\text{g/ml}$). Szczep oporny na lisostafinę.

60 O (R=O=K)



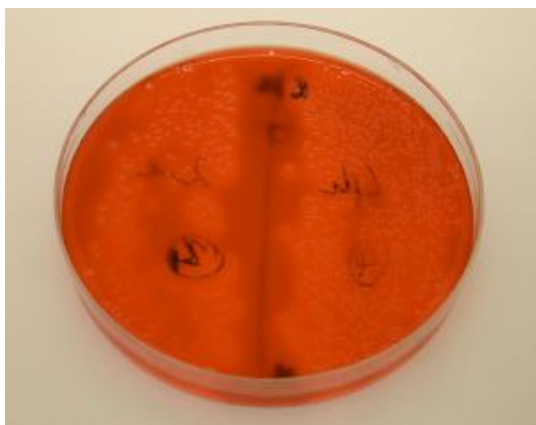
Fot. 59 Stężenie końcowe szczepu nr 60 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 60 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i lisostafiną ($20\mu\text{g/ml}$). Szczep oporny na lisostafinę.

4 K_r (K≠R)

Fot. 60 Stężenie końcowe szczepu nr 4 - brak kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i lisostafiną ($20\mu\text{g/ml}$). Szczep wrażliwy na lisostafinę.

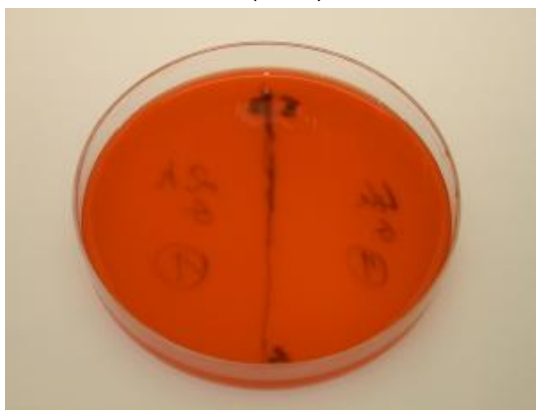
5 K_i (K=R)

Fot. 61 Stężenie końcowe szczepu nr 5 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 5 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i gentamycyną (100 μ g/ml). Szczep wrażliwy na gentamycynę.

4 K_r (K \neq R)

Fot. 62 Stężenie końcowe szczepu nr 4 - brak kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i gentamycyną (100 μ g/ml). Szczep odporny na gentamycynę.

1 O (O=K)



Fot. 63 Stężenie końcowe szczepu nr 1 - brak kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 1 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i gentamycyną (100 μ g/ml). Szczep wrażliwy na gentamycynę.

4.9 Ocena badania adherencji i inwazji *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2.

Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki epitelialne i endotelialne.

Pierwszym etapem prowadzącym do translokacji bakteryjnej jest adherencja do komórek nabłonkowych śluzówki. Następnie może dochodzić do inwazji bakteryjnej, a następnie do translokacji bakteryjnej. Translokacja może się odbywać przez komórki nabłonkowe (transcelularna), wtedy dochodzi do inwazji bakteryjnej lub pomiędzy komórkami (paracelularna), wtedy ulegają uszkodzeniu połączenia międzykomórkowe (obwódki zamykające, desmosomalne ("tight junctions")).

Do doświadczeń użyto komórki Caco-2, które znajdowały się w różnych etapach hodowli. Wszystkie komórki były doprowadzone do etapu, w którym komórki stykały się ze sobą błonami komórkowymi i następowała agregacja komórkowa - stadium "Confluent cells" CC.

Kolejne etapy hodowli, różniły się między sobą stopniem agregacji i wiekiem komórek, uzyskanym po odpowiednim okresie czasu, który upłynął po osiągnięciu w/w etapu – stadium "Post confluent" PC.

Badanie adherencji i inwazji *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC na komórki Caco-2 (w stadium 2-3 dni PC, 8-9 dni PC i 16-17 PC).

Po inkubacji całonocnej w 37°C policzono ilość koloni gronkowca złocistego WT i MT w celu obliczenia stężenia wyjściowego oraz końcowego.

Badanie inwazji gronkowców WT i MT na komórki Caco-2.

Antybiotyk	16-17 PC		8-9 PC		2-3 PC	
	WT	MT	WT	MT	WT	MT
+ gent.	0	0	0	0	0	0
+ gent.	0	0	0	0	0	0

Tab. 61 Stężenie końcowe WT, MT - ilość kolonii bakteryjnych przy rozcieńczeniu 10^{-5} (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC)

Stężenie wyjściowe

Ilość kolonii WT (2) przy rozcieńczeniu $10^{-7} = 2$, WT (2) = 1×10^9 CFU/ml

Ilość kolonii MT (2) przy rozcieńczeniu $10^{-7} = 1$, MT (2) = 5×10^8 CFU/ml

W tym doświadczeniu nie wystąpiła inwazja gronkowców WT i MT, prawdopodobnie ze względu na dodanie 1 ml 1% Triton X po inkubacji z antybiotykiem. W kolejnych doświadczeniach z wcześniej wymienionymi gronkowcami i *S. enteritidis* oraz szczepami klinicznymi *S. aureus* dodano 500 ml 1% Triton X (Sigma) i 500 ml DTS zamiast 1 ml 1% Triton X, który powodował degradację komórek. Zbyt duże jego stężenie mogło także spowodować zniszczenie komórek bakteryjnych.

Badanie adherencji gronkowców WT i MT na komórki Caco-2

Antybiotyk	16-17 PC		8-9 PC		2-3PC	
	WT	MT	WT	MT	WT	MT
- gent.	20	15	13	35	2	21
- gent.	25	65	15	47	31	32

Tab. 62 Ilość koloni gronkowców WT i MT przy rozcieńczeniu 10^{-5} (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC).

Stężenie wyjściowe

Ilość kolonii WT (3) przy rozcieńczeniu $10^{-8} - 2$, WT (2) = 1×10^{10} CFU/ml

Ilość kolonii MT (3) przy rozcieńczeniu $10^{-7} - 2$, MT (2) = 1×10^9 CFU/ml

Antybiotyk	16-17 PC		8-9 PC		2-3 PC	
	WT	MT	WT	MT	WT	MT
- gent.	1×10^8	$0,75 \times 10^8$	$0,65 \times 10^8$	$1,75 \times 10^8$	1×10^7	$1,05 \times 10^8$
- gent.	$1,25 \times 10^8$	$3,25 \times 10^8$	$0,75 \times 10^8$	$2,35 \times 10^8$	$1,55 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$

Tab. 63 Stężenie końcowe gronkowców WT i MT (CFU/ml) (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC).

Zaobserwowano wysokie stężenie końcowe bakterii, co może świadczyć o wysokiej predyspozycji gronkowców do adherencji względem nabłonka jelitowego. Stadium komórek Caco-2 (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC) nie wpłynęło na adherencję szczepów.

Badanie adherencji i inwazji *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis* (pozytywna kontrola) na komórki Caco-2 (w stadium 3-4 dni PC).

Antybiotyk	Kontrola	WT	MT	S1400
+ gent.	1) 0	5) (10^{-2}) 3	9) (10^{-1}) 4	13) (10^{-4}) 1
+ gent.	2) 0	6) (10^{-2}) 5	10) (10^{-3}) 1	14) (10^{-4}) 1
- gent.	3) 0	7) (10^{-5}) 45	11) (10^{-5}) 48	15) (10^{-5}) 24
- gent.	4) 0	8) (10^{-5}) 54	12) (10^{-5}) 40	16) (10^{-5}) 21

Tab. 64 Ilość koloni szczepów WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} .

Stężenie wyjściowe:

Ilość kolonii WT przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 10 kolonii, WT = 5×10^9 CFU/ml

Ilość kolonii MT przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 6 kolonii, MT = 3×10^9 CFU/ml

Ilość kolonii S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 4 kolonie, S1400 = 2×10^9 CFU/ml

Antybiotyk	Kontrola	WT	MT	S1400
+ gent.	1) 0	5) $1,5 \times 10^4$	9) 2×10^3	13) 5×10^5
+ gent.	2) 0	6) $2,5 \times 10^4$	10) 5×10^4	14) 5×10^5
- gent.	3) 0	7) $2,25 \times 10^8$	11) $2,4 \times 10^8$	15) $1,2 \times 10^8$
- gent.	4) 0	8) $2,7 \times 10^8$	12) 2×10^8	16) $1,05 \times 10^8$

Tab. 65 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml).

W tym doświadczeniu zaobserwowano zarówno inwazję jak i adherencję gronkowców WT i MT oraz *Salmonella enteritidis* do komórek Caco-2. Adherencja i inwazja gronkowców i *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 10^9 CFU/ml. Komórki bakteryjne rozpoczęły proces kolonizacji poprzez adherencję do komórek Caco-2 w ilości 10^8 CFU/ml. Gronkowce i *Salmonella* dokonały inwazji na komórki epitelialne osiągając stężenie: 10^4 dla WT i 10^3 - 10^4 dla MT oraz 10^5 dla *Salmonella enteritidis*.

Badanie adherencji i inwazji *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 (7-8 PC).

Antybiotyk	Kontrola	WT	MT	S1400
+ gent.	1) 0	5) (10^{-1}) 5	9) (10^{-2}) 2	13) (10^{-3}) 6
+ gent.	2) 0	6) (10^{-1}) 4	10) (10^{-1}) 4	14) (10^{-4}) 2
- gent.	3) 0	7) (10^{-5}) 11	11) (10^{-5}) 12	15) (10^{-5}) 15
- gent.	4) 0	8) (10^{-5}) 13	12) (10^{-5}) 24	16) (10^{-5}) 16

Tab. 66 Ilość koloni gronkowców WT i MT przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} (7-8PC).

Stężenie wyjściowe:

Ilość kolonii WT przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 3 kolonie, WT = $1,5 \times 10^{10}$ CFU/ml

Ilość kolonii MT przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 1 kolonia, MT = 5×10^8 CFU/ml

Ilość kolonii S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 1 kolonia, S1400 = 5×10^9 CFU/ml

Antybiotyk	Kontrola	WT	MT	S1400
+ gent.	1) 0	5) 2.5×10^3	9) 1×10^4	13) 3×10^5
+ gent.	2) 0	6) 2×10^3	10) 2×10^3	14) 1×10^6
- gent.	3) 0	7) 5.5×10^7	11) 6×10^7	15) 1.8×10^7
- gent.	4) 0	8) 6.5×10^7	12) 1.2×10^8	16) 1.7×10^7

Tab. 67 Stężenie końcowe gronkowców WT, MT, S1400 (CFU/ml) (7-8 PC).

W tym doświadczeniu zaobserwowano zarówno inwazję jak i adherencję gronkowców WT i MT oraz *Salmonella enteritidis* do komórek Caco-2.

Adherencja i inwazja bakterii na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 10^{10} CFU/ml dla WT, 10^8 CFU/ml dla MT oraz 10^9 CFU/ml dla *Salmonella enteritidis*. Na powierzchni komórek pozostało 10^7 CFU/ml dla WT oraz 10^7 i 10^8 CFU/ml dla MT. Gronkowce i *Salmonella* dokonały inwazji na komórki epitelialne osiągając stężenie: 10^3 dla WT i 10^3 - 10^4 dla MT oraz przy stężeniu 10^5 - 10^6 dla *Salmonella enteritidis*.

Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki epitelialne (4-5 PC, 10-11PC).

	K	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R ¹ K MSSA	4 (K _r) K ¹ R MSSA	5 (K _i) K=R MRSA	8 (K _r) K ¹ R MRSA	12 (K _i) K=R MRSA	20 (K _i) K=R MRSA	26 (K _i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	0	(10^{-7}) 5	(10^{-8}) 1 (10^{-7}) 9	(10^{-8}) 1 (10^{-7}) 7	(10^{-8}) 8	(10^{-6}) 26	(10^{-8}) 1 (10^{-5}) 10	(10^{-8}) 4 (10^{-7}) 26	(10^{-7}) 1 (10^{-6}) 9
Stęż. końc. 4-5 PC	0	(10^{-2}) 3	(10^{-3}) 1	(10^{-4}) 2	(10^{-1}) 14	(10^{-2}) 2	(10^{-1}) 1	(10^{-3}) 1	(10^{-2}) 1
Stęż. końc. 10-11 PC	0	(10^{-4}) 1	(10^{-3}) 1 (10^{-2}) 9	(10^{-3}) 1 (10^{-2}) 22	(10^{-5}) 1	(10^{-3}) 1	(10^{-2}) 2	(10^{-2}) 11 (10^{-3}) 1	(10^{-3}) 6

	42 (K _r) K ¹ R MRSA	48 (K _i) K=R MRSA	53 (K _i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K _r) K ¹ R MRSA	72 (K _r) K ¹ R MRSA	78 (K _i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	(10^{-7}) 11	(10^{-8}) 1 (10^{-7}) 12	(10^{-7}) 2 (10^{-6}) 46	(10^{-7}) 2	(10^{-7}) 2	(10^{-8}) 3	(10^{-9}) 1 (10^{-8}) 8	(10^{-8}) 4
Stęż. końc. 4-5 PC	(10^{-3}) 1	(10^{-4}) 2	(10^{-2}) 11	(10^{-4}) 1 (10^{-3}) 3	(10^{-2}) 3	(10^{-3}) 1	(10^{-3}) 2	(10^{-3}) 3
Stęż. końc. 10-11 PC	(10^{-4}) 1 (10^{-3}) 3	(10^{-3}) 4	(10^{-3}) 2 (10^{-4}) 26	(10^{-3}) 1 (10^{-2}) 7	(10^{-2}) 6	(10^{-3}) 4 (10^{-2}) 28	(10^{-2}) 11	(10^{-3}) 11

Tab. 68 Stężenie początkowe i końcowe – ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* przy rozcieńczeniu 10^0 – 10^{-9} (4-5 PC, 10-11PC).

	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA
Stęż. pocz.	5×10^8	1×10^9 0.9×10^9	1×10^9 0.7×10^9	0.8×10^{10}	2.6×10^9
4-5 PC	1.5×10^4	5×10^4	1×10^6	7×10^3	1×10^4
Współ. il. - Stęż. pocz./ stęż.końc.	3×10^{-5}	5×10^{-5} 5.5×10^{-5}	1×10^{-3} 1.4×10^{-3}	8.7×10^{-7}	3.8×10^{-6}
Współ. il. śr.($\times 10^5$)	3	5 5.5	100 140	0.087	0.38
Współ. il. średni ($\times 10^5$)	3	5.25	120	0.087	0.38
10-11 PC	5×10^5	4.5×10^4 5×10^4	5×10^4 1.1×10^5	5×10^4	5×10^4
Współ. il. - Stęż. pocz./ stęż.końc.	1×10^{-3}	4.5×10^{-5} 5×10^{-5} 5.5×10^{-5}	5×10^{-5} 7.1×10^{-5} 1.1×10^{-4} 1.5×10^{-4}	6.2×10^{-6}	1.9×10^{-5}
Współ. il. ($\times 10^5$)	100	4.5 5 5.5	5 7.1 11 15	0.62	1.9
Współ. il. śr. ($\times 10^5$)	100	5	9.5	0.62	1.9

Tab. 69 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (4-5 PC, 10-11PC).

	12 (K _i) K=R MRSA	20 (K _i) K=R MRSA	26 (K _i) K=R MRSA	42 (K _r) K ¹ R MRSA	48 (K _i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	1× 10 ⁷ 5× 10 ⁸	4× 10 ⁹ 2.6× 10 ⁹	1× 10 ⁸ 0.9× 10 ⁸	1.1× 10 ⁹	1× 10 ⁹ 1.2× 10 ⁹
4-5 PC	5× 10 ²	5× 10 ⁴	5× 10 ³	5× 10 ⁴	1× 10 ⁶
Współ. il. -stęż. pocz./stęż. końc.	5× 10 ⁻⁵ 1× 10 ⁻⁶	1.25× 10 ⁻⁵ 1.92× 10 ⁻⁵	5× 10 ⁻⁵ 5.5× 10 ⁻⁵	4.5× 10 ⁻⁵	1× 10 ⁻³ 1.2× 10 ⁻³
Współ. il. (×10 ⁵)	5 0.1	1.25 1.92	5 5.5	4.5	100 120
sr. współ. il. (×10 ⁵)	2.55	1.58	5.25	4.5	110
10-11 PC	1× 10 ⁴	5× 10 ⁴	3× 10 ⁵	5× 10 ⁵ 1.5× 10 ⁵	2× 10 ⁵
Współ. il.	1× 10 ⁻³ 2× 10 ⁻⁵	1.25× 10 ⁻⁵ 1.9× 10 ⁻⁵	3× 10 ⁻³ 3.3× 10 ⁻³	4.5× 10 ⁻⁴ 1.3× 10 ⁻⁴	2× 10 ⁻⁴ 1.6× 10 ⁻⁴
Współ. il. (×10 ⁵)	100 2	1.25 1.9	300 330	45 13	20 16
sr. współ. il. (×10 ⁵)	51	1.57	315	29	18

Tab. 70 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (4-5 PC, 10-11PC) c.d.

	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K_r) K¹R MRSA	72 (K_r) K¹R MRSA	78 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	2× 10 ⁸ 4.6× 10 ⁸	2× 10 ⁸	2× 10 ⁸	3× 10 ⁹	1× 10 ¹⁰ 0.8× 10 ¹⁰	4× 10 ⁹
4-5 PC	5.5× 10 ⁴	5× 10 ⁵ 1.5× 10 ⁵	1.5× 10 ⁴	5× 10 ⁴	1× 10 ⁵	1.5× 10 ⁵
Współ. il. -stęż. pocz./st. końc.	2.7× 10 ⁻⁴ 1.2× 10 ⁻⁴	2.5× 10 ⁻³ 0.7× 10 ⁻³	0.7× 10 ⁻⁴	1.6× 10 ⁻⁵	1× 10 ⁻⁵ 1.2× 10 ⁻⁵	0.3× 10 ⁻⁴
Współ. il. (×10 ⁵)	27 12	250 70	7	1.6	1 1.2	3
sr. współ. il. (×10 ⁵)	19.5	160	7	1.6	1.1	3
10-11 PC	1× 10 ⁵ 1.3× 10 ⁵	3.5× 10 ⁴ 5× 10 ⁴	3× 10 ⁴	2× 10 ⁵ 1.4× 10 ⁵	5.5× 10 ⁴	5.5× 10 ⁵
Współ. ilościowy	5× 10 ⁻⁴ 2× 10 ⁻⁴ 6× 10 ⁻⁴ 3× 10 ⁻⁴	1.7× 10 ⁻⁴ 2.5× 10 ⁻⁴	1.5× 10 ⁻⁴	6× 10 ⁻⁵ 4× 10 ⁻⁵	5.5× 10 ⁻⁶ 6.8× 10 ⁻⁶	1.4× 10 ⁻⁴
Współ. (×10 ⁵)	50 20 60 30	17 25	15	6 4	0.55 0.68	14
sr. współ. (×10 ⁵)	160	21	15	5	0.61	14

Tab.71 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (4-5 PC, 10-11PC) c.d.

Tab 72 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne (4-5 PC, 10-11PC).

komórki Caco-2 (4-5 PC):			komórki Caco-2 (10-11 PC):		
Lp	nr szczepu	śr. współczynnik	Lp	nr szczepu	śr. współczynnik
1	58	160	1	26	315
2	4	120	2	53	160
3	48	110	3	1	100
4	53	19,5	4	12	51
5	59	7	5	42	29
6	26	5,25	6	58	21
7	3	5,25	7	48	18
8	42	4,5	8	59	15
9	1	3,0	9	78	14
10	78	3,0	10	4	9,5
11	12	2,55	11	63	5,0
12	63	1,6	12	3	5
13	20	1,58	13	8	1,9
14	72	1,1	14	20	1,57
15	8	0,38	15	5	0,62
16	5	0,087	16	72	0,61

W doświadczeniu zaobserwowano inwazję wyselekcjonowanych szczepów klinicznych do komórek Caco-2 (4-5 PC; 10-11 PC).

Inwazja gronkowców i *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 10^7 - 10^{10} CFU/ml.

Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2: 4-5 PC należą szczepy nr: 58 (R, R=K=O), 4 (K_r , $K \neq R$), 48 (K_i , R=K), 53 (K_i , R=K).

Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z kom. Caco-2: 10-11 PC należą szczepy nr: 26 (K_i , R=K), 53 (K_i , R=K), 1(O, O=K), 12 (K_i , R=K).

Do najmniej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2: 4-5 PC jak i 10-11PC należą szczepy nr: 20 (K_i , R=K), 72 (K_i , R=K, $K \neq O$), 8 (K, $K \neq R$), 5 (K_i , R=K).

Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki epitelialne (3-4 PC, 17-18PC).

	K	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA	12 (K_i) K=R MRSA	20 (K_i) K=R MRSA	26 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	0	(10 ⁻⁷) 4	(10 ⁻⁷) 6	(10 ⁻⁸) 1	(10 ⁻⁸) 6	(10 ⁻⁵) 10	(10 ⁻⁸) 2	(10 ⁻⁸) 5	(10 ⁻⁷) 4
Stęż. końc. 3-4 PC	0	(10 ⁻²) 1	(10 ⁻²) 2	(10 ⁻³) 1	(10 ⁻²) 5	0	(10 ⁻¹) 5	(10 ⁻³) 1	(10 ⁻²) 21
Stęż. końc. 17-18 PC	0	(10 ⁻³) 1	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 16	(10 ⁻⁴) 2	(10 ⁻³) 4	0	(10 ⁻²) 7	(10 ⁻²) 1 (10 ⁻¹) 18	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 12

	42 (K_r) K¹R MRSA	48 (K_i) K=R MRSA	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K_r) K¹R MRSA	72 (K_r) K¹R MRSA	78 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	(10 ⁻⁶) 6	(10 ⁻⁸) 10	(10 ⁻⁵) 20	(10 ⁻⁸) 1	(10 ⁻⁷) 1 (10 ⁻⁶) 14	(10 ⁻⁸) 2	(10 ⁻⁸) 1	(10 ⁻⁸) 3
Stęż. końc. 3-4 PC	(10 ⁻²) 4	(10 ⁻³) 2	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 7	(10 ⁻²) 6	(10 ⁻²) 4	(10 ⁻³) 1	(10 ⁻²) 5	(10 ⁻²) 2
Stęż. końc. 17-18 PC	(10 ⁻⁴) 1	(10 ⁻⁵) 1	(10 ⁻⁴) 1	(10 ⁻²) 11	(10 ⁻⁵) 1	(10 ⁻³) 2	(10 ⁻⁴) 1	(10 ⁻³) 2

Tab. 73 Stężenie początkowe i końcowe - ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* przy rozcieńczeniu 10⁰ – 10⁻⁹ (3-4 PC, 17-18PC).

48 (MRSA) (K_i , $R=K$)

Fot. 64 Stężenie początkowe szczepu nr 48 - ilość kolonii wyselekcjonowanego szczepu klinicznego *S.aureus* – MRSA nr 48 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-9} .

48 (3-4 PC)

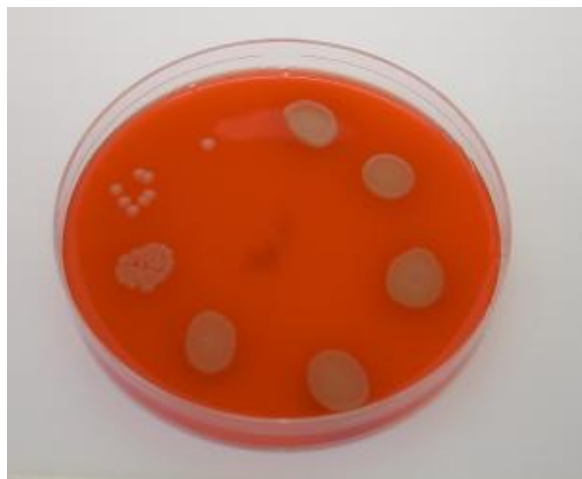


48 (17-18 PC)



Fot. 65 Stężenie końcowe szczepu nr 48 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 48 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 (3-4 PC) oraz (17-18 PC).

4 (MSSA) (K, R≠K)



Fot. 66 Stężenie początkowe szczepu nr 4 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-9} .

4 (17-18 PC)



Fot. 67 Stężenie końcowe szczepu nr 4 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^0 – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 (17-18 PC).

	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA
Stęż. pocz.	4×10^8	6×10^8	1×10^9	6×10^9	1×10^7
Stęż. końc. 3-4 PC	5×10^3 4×10^3	1×10^4	5×10^4	2.5×10^4	0
Współ. il. - Stęż. pocz./stęż.k ońc.	1.25×10^{-5} 1×10^{-5}	1×10^{-5}	5×10^{-5}	4×10^{-6}	0
Współ. il. śr.($\times 10^5$)	1.25 1	1	5	0.4	0
Współ. il. średni ($\times 10^5$)	1.12	1	5	0.4	0
Stęż. końc. 17-18 PC	5×10^4	8×10^4 5×10^4	1×10^6	2×10^4 2×10^5	0
Współ. il. - Stęż. pocz./stęż.k ońc.	1.25×10^{-4}	1.3×10^{-4} 0.8×10^{-4}	1×10^{-3}	3×10^{-6} 3×10^{-5}	0
Współ. il. ($\times 10^5$)	12.5	13 8	100	0.3 3	0
Współ. il. śr. ($\times 10^5$)	12.5	10.5	100	1.65	0

Tab. 74 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 17-18PC).

	12 (K_i) K=R MRSA	20 (K_i) K=R MRSA	26 (K_i) K=R MRSA	42 (K_i) K¹R MRSA	48 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	2×10^9	5×10^9	4×10^8	6×10^7	1×10^{10}
Stęż. końc. 3-4 PC	2.5×10^3	5×10^4	1.05×10^5	2×10^4	1×10^5
Współ. il. -stęż. pocz./stęż. końc.	1.25×10^{-6}	1×10^{-5}	3×10^{-4}	3×10^{-4}	1×10^{-5}
Współ. il. ($\times 10^5$)	0.12	1	30	30	1
sr. współ. il. ($\times 10^5$)	0.12	1	30	30	1
Stęż. końc. 17-18 PC	3.5×10^3 3.5×10^4	5×10^3 9×10^3	5×10^4 6×10^4	5×10^5	5×10^6
Współ. il.	1.7×10^{-6} 1.7×10^{-5}	1×10^{-6} 1.8×10^{-6}	1.2×10^{-4} 1.5×10^{-5}	8×10^{-3}	5×10^{-4}
Współ. il. ($\times 10^5$)	0.2 1.7	0.1 0.2	12 1.5	800	50
sr. współ. il. ($\times 10^5$)	0.95	0.15	6.75	800	50

Tab. 75 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 17-18PC) c.d.

	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K_r) K¹R MRSA	72 (K_r) K¹R MRSA	78 (K_i) K=R MRSA
Stęż. począz.	2× 10 ⁷ 1× 10 ⁷	5× 10 ⁹	1× 10 ⁸ 1.4× 10 ⁸	2× 10 ⁹	1× 10 ⁹	3× 10 ⁹
Stęż. końc. 3-4 PC	3.5× 10 ⁴ 5× 10 ⁴	3× 10 ⁴	2× 10 ⁴	5× 10 ⁴	2.5× 10 ⁴	1× 10 ⁴
Współ. il. -stęż. począz./st. końc.	1.7× 10⁻³ 3.5× 10⁻³ 2.5× 10⁻³ 5× 10⁻³	6× 10⁻⁶	2× 10⁻⁴ 1.4× 10⁻⁴	2.5× 10⁻⁵	2.5× 10⁻⁵	3× 10⁻⁶
Współ. il. (×10 ⁵)	170 350 250 500	0.6	20 14	2.5	2.5	0.3
sr. współ. il. (×10 ⁵)	317.5	0.6	17	2.5	2.5	0.3
Stęż. końc. 17-18 PC	5× 10 ⁵	5.5× 10 ⁴	5× 10 ⁶	1× 10 ⁵	5× 10 ⁵	1× 10 ⁵
Współ. ilościowy	2.5× 10⁻² 5× 10⁻²	1.1× 10⁻⁵	5× 10⁻² 3.6× 10⁻²	5× 10⁻⁵	5× 10⁻⁴	3× 10⁻⁵
Współ. (×10 ⁵)	2.5× 10⁻² 5× 10⁻²	1.1	5× 10⁻² 3.6× 10⁻²	5	50	3
sr. współ. (×10 ⁵)	3750	1.1	4300	5	50	3

Tab. 76 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. począz. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 17-18PC) c.d.

Tab 77 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne (3-4 PC, 17-18PC).

komórki Caco-2 (3-4 PC):			komórki Caco-2 (17-18 PC):		
Lp	nr szczepu	śr. współczynnik	Lp	nr szczepu	śr. współczynnik
1	53	317,5	1	59	4300
2	42	30	2	53	3750
3	26	17	3	42	800
4	59	17	4	4	100
5	4	5	5	48	56
6	63	2,5	6	72	50
7	72	2,5	7	1	12,5
8	1	1,12	8	3	10,5
9	3	1	9	26	6,75
10	20	1	10	63	5
11	48	1	11	78	3
12	58	0,6	12	5	3
13	5	0,4	13	12	1,75
14	78	0,3	14	58	1,1
15	12	0,12	15	20	0,15
16	8	0	16	8	0

W doświadczeniu zaobserwowano inwazję wyselekcjonowanych szczepów klinicznych do komórek Caco-2 (4-5 PC; 17-18 PC).

Inwazja gronkowców na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 10^7 - 10^{10} CFU/ml.

Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2 4-5 PC należą szczepy nr: 53 (K_i , $R=K$), 42 (K_r , $K \neq R$), 26 (K_i , $R=K$),

59 (O , $O=R=K$), 4 (K_r , $K \neq R$).

Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2 17-18 PC należą szczepy nr: 59 (O , $O=R=K$), 53 (K_i , $R=K$), 42 (K_r , $K \neq R$),

4 (K_r , $K \neq R$).

Do najmniej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z kom. Caco-2: 4-5 PC należą szczepy nr: 5 (K_i , $R=K$), 78 (K_i , $R=K$), 12 (K_i , $R=K$), 8 (K_r , $K \neq R$).

Do najmniej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z kom. Caco-2: 17-18 PC należą szczepy nr: 12 (K_i , $R=K$), 58 (R , $R=K=O$), 20 (K_i , $R=K$),

8 (K_r , $K \neq R$).

Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki epitelialne (3-4 PC, 10-11PC).

	K	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA	12 (K_i) K=R MRSA	20 (K_i) K=R MRSA	26 (K_i) K=R MRSA
Stęż.p ocz.	0	(10 ⁻⁸) 2	(10 ⁻⁸) 70	(10 ⁻⁸) 8	(10 ⁻⁸) 70	(10 ⁻⁸) 85	(10 ⁻⁸) 100	(10 ⁻⁸) 50	(10 ⁻⁸) 50
Stęż. końc. 3-4 PC	0	(10 ⁻²) 11 (10 ⁻³) 2 (10 ⁻⁴) 1	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 14	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 17	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 5	(10 ⁻²) 8	(10 ⁻²) 5	(10 ⁻²) 8	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 3
Stęż. końc. 10-11 PC	0	(10 ⁻⁵) 1 (10 ⁻⁴) 2	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 17	(10 ⁻³) 2	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻⁴) 1 (10 ⁻²) 5	(10 ⁻²) 3	(10 ⁻²) 7	(10 ⁻²) 2 (10 ⁻¹) 14	(10 ⁻⁴) 1 (10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 24

	42 (K_r) K¹R MRSA	48 (K_i) K=R MRSA	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K_r) K¹R MRSA	72 (K_r) K¹R MRSA	78 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	(10 ⁻⁸) 200	(10 ⁻⁸) 150	(10 ⁻⁸) 200	(10 ⁻⁸) 17	(10 ⁻⁶) 250	(10 ⁻⁸) 200	(10 ⁻⁸) 50	(10 ⁻⁸) 200
Stęż. końc. 3-4 PC	(10 ⁻²) 34	(10 ⁻²) 14	(10 ⁻²) 6	(10 ⁻²) 15 (10 ⁻³) 2	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 36	(10 ⁻³) 6	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 21	(10 ⁻²) 14
Stęż. końc. 10-11 PC	(10 ⁻⁴) 1 (10 ⁻³) 3	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 50	(10 ⁻³) 10	(10 ⁻²) 6	(10 ⁻⁴) 4 (10 ⁻³) 7	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 11	(10 ⁻⁴) 2 (10 ⁻³) 4	(10 ⁻³) 1 (10 ⁻²) 8

Tab. 78 Stężenie początkowe i końcowe - ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* przy rozcieńczeniu 10⁰ – 10⁻⁸ (3-4 PC, 10-11PC).

	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA
Stęż. pocz.	2×10^9	7×10^{10}	8×10^9	7×10^9	8.5×10^{10}
Stęż. końc. 3-4 PC	2×10^5	6×10^4	5×10^4	4×10^4	4×10^4
Współ. il. - Stęż. pocz./stęż.k ońc.	1×10^{-4}	0.8×10^{-6}	0.6×10^{-5}	0.5×10^{-5}	0.5×10^{-6}
Współ. il. śr.($\times 10^5$)	1×10^3	0.8×10	0.6×10^2	0.5×10^2	0.5×10^1
Współ. il. średni ($\times 10^5$)	1000	8	60	50	5
Stęż. końc. 10-11 PC	3×10^6	1×10^5	1×10^5	6×10^4	1.5×10^4
Współ. il. - Stęż. pocz./stęż.k ońc.	1.5×10^{-3}	0.1×10^{-5}	0.1×10^{-5}	0.8×10^{-5}	0.2×10^{-6}
Współ. il. ($\times 10^5$)	1.5×10^4	0.1×10^2	0.1×10^2	0.8×10^2	0.2×10^1
Współ. il. śr. ($\times 10^5$)	15000	10	10	80	2

Tab. 79 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 10-11PC).

	12 (K_i) K=R MRSA	20 (K_i) K=R MRSA	26 (K_i) K=R MRSA	42 (K_i) K¹R MRSA	48 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	1×10^{11}	5×10^{10}	5×10^{10}	2×10^{11}	1.5×10^{11}
Stęż. końc. 3-4 PC	2.5×10^4	4×10^4	3×10^4	1.7×10^5	7×10^4
Współ. il. -stęż. pocz./stęż. końc.	2.5×10^{-7}	0.8×10^{-6}	0.6×10^{-6}	0.8×10^{-6}	0.6×10^{-7}
Współ. il. ($\times 10^5$)	2.5	0.8×10^1	0.6×10^1	0.8×10^1	0.6
sr. współ. il. ($\times 10^5$)	2.5	8	6	8	0.6
Stęż. końc. 10-11 PC	3.5×10^4	8.5×10^3	2×10^5	2.6×10^5	1.7×10^5
Współ. il.	3.5×10^{-7}	1.7×10^{-7}	0.4×10^{-5}	1.3×10^{-6}	1.1×10^{-6}
Współ. il. ($\times 10^5$)	3.5	1.7	0.4×10^2	1.3×10^1	1.1×10^1
sr. współ. il. ($\times 10^5$)	3.5	1.7	4	13	11

Tab. 80 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 10-11PC) c.d.

	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K_r) K¹R MRSA	72 (K_r) K¹R MRSA	78 (K_i) K=R MRSA
Stęż. począz.	2×10^{11}	1.7×10^{10}	2.5×10^{11}	2×10^{11}	5×10^{10}	2×10^{11}
Stęż. końc. 3-4 PC	3×10^4	1×10^5	1.4×10^5	3×10^5	1×10^5	7×10^4
Współ. il. -stęż. począz./st. końc.	1.5×10^{-7}	0.6×10^{-5}	0.5×10^{-6}	1.5×10^{-6}	0.2×10^{-5}	3.5×10^{-7}
Współ. il. ($\times 10^5$)	1.5	0.6×10^2	0.5×10^1	1.5×10^1	0.2×10^2	3.5
sr. współ. il. ($\times 10^5$)	1.5	60	5	15	20	3.5
Stęż. końc. 10-11 PC	5×10^5	3×10^4	1×10^6	3×10^5	6×10^5	2×10^5
Współ. ilościowy	2.5×10^{-6}	1.7×10^{-6}	0.4×10^{-5}	1.5×10^{-6}	1.2×10^{-5}	1×10^{-6}
Współ. ($\times 10^5$)	2.5×10^1	1.7×10^1	0.4×10^2	1.5×10^1	1.2×10^2	1×10^1
sr. współ. ($\times 10^5$)	25	17	40	15	120	10

Tab. 81 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 10-11PC) c.d.

Tab 82 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne (3-4 PC, 10-11PC).

komórki Caco-2 (3-4 PC):			komórki Caco-2 (10-11 PC):		
Lp	nr szczepu	śr. współczynnik	Lp	nr szczepu	śr. współczynnik
1	1	1000	1	1	15000
2	4	60	2	72	120
3	58	60	3	5	80
4	5	50	4	59	40
5	72	20	5	53	25
6	63	15	6	58	17
7	3	8	7	63	15
8	20	8	8	42	13
9	42	8	9	48	11
10	26	6	10	78	10
11	8	5	11	3	10
12	59	5	12	4	10
13	78	3,5	13	26	4
14	12	2,5	14	12	3,5
15	53	1,5	15	8	2
16	48	0,6	16	20	1,7

W doświadczeniu zaobserwowano inwazję wyselekcjonowanych szczepów klinicznych do komórek Caco-2 (4-5 PC; 17-18 PC).

Inwazja gronkowców na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 10^9 - 10^{11} CFU/ml.

Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2 3-4 PC należą szczepy nr: 1 (O, O=K), 4 (K_r , $K \neq R$), 58 (R, $K=R=O$),

5 (K_i , R=K), Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji

z komórkami Caco-2 10-11 PC należą szczepy nr: 1 (O, O=K), 72 (K_r , $K \neq R \neq O$),

5 (K_i , R=K), 59 (O, O=R=K).

Do najmniej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2:3-4 PC należą szczepy nr: 78 (K_i , R=K), 12 (K_i , R=K), 53 (K_i , R=K), 48 (K_i , R=K).

Do najmniej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z kom. Caco-2:

10-11 PC należą szczepy nr: 26 (K_i , R=K), 12 (K_i , R=K), 8 (K_r , $K \neq R$), 20 (K_i , R=K).

Podsumowanie:Tab. 83 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne – komórki epitelialne (3-5 PC).

Komórki Caco-2	Szczepy	
	najbardziej inwazyjne	najmniej inwazyjne
3-4 PC	1, 4, 58, 5	78, 12, 53, 48
3-4 PC	53, 42, 59, 4	5, 78, 12, 8
4-5 PC	58, 4, 48, 53	20, 72, 8, 5
à	4, 53, 58	5, 8, 12, 78

Do najbardziej inwazyjnych szczepów po inkubacji z kom. Caco-2 (3-5 PC) należą szczepy: 4 ($K_r, K \neq R$), 53 ($K_i, R=K$), 58 ($R, K=R=O$).

Do najmniej inwazyjnych szczepów po inkubacji z kom. Caco-2 (3-5 PC) należą szczepy: 5 ($K_i, R=K$), 8 ($K_r, K \neq R$), 12 ($K_i, R=K$), 78 ($K_i, R=K$).

Tab. 84 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne – komórki epitelialne (10-17 PC).

Komórki Caco-2	Szczepy	
	najbardziej inwazyjne	najmniej inwazyjne
10-11 PC	1, 72, 5, 59	26, 12, 8, 20
10-11 PC	26, 53, 1, 12	8, 20, 5, 72
17-18 PC	59, 53, 42, 4	12, 58, 20, 8
à	1, 53, 59	8, 12, 20

Do najbardziej inwazyjnych szczepów po inkubacji z kom. Caco-2 (10-17 PC) należą szczepy: 1 ($O, O=K$), 53 ($K_i, R=K$), 59 ($O, O=R=K$).

Do najmniej inwazyjnych szczepów po inkubacji z kom. Caco-2 (10-17 PC) należą szczepy: 8 ($K_r, K \neq R$), 12 ($K_i, R=K$), 20 ($K_i, R=K$).

Badanie inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* na komórki endotelialne (NHDMEC – Normal Human Dermal Microvascular Endothelial Cells).

	K	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R ¹ K MSSA	4 (K _r) K ¹ R MSSA	5 (K _i) K=R MRSA	8 (K _r) K ¹ R MRSA	12 (K _i) K=R MRSA	20 (K _i) K=R MRSA	26 (K _i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	0	(10 ⁻⁷) 3 (10 ⁻⁶) 45	(10 ⁻⁷) 3 (10 ⁻⁶) 53	(10 ⁻⁷) 1 (10 ⁻⁶) 26	(10 ⁻⁷) 8	(10 ⁻⁷) 5 (10 ⁻⁶) 20	(10 ⁻⁸) 2 (10 ⁻⁷) 6	(10 ⁻⁷) 6	(10 ⁻⁸) 2 (10 ⁻⁷) 6
Stęż. końc. I	0	(10 ⁻⁵) 6	(10 ⁻³) 2 (10 ⁻²) 35	(10 ⁻⁴) 51	(10 ⁻⁵) 1 (10 ⁻⁴) 9	(10 ⁻⁵) 20	(10 ⁻³) 4	(10 ⁻⁵) 21	(10 ⁻³) 4 (10 ⁻²) 22
Stęż. końc. II	0	(10 ⁻⁴) 10	(10 ⁻³) 11	(10 ⁻⁵) 11	(10 ⁻⁵) 14	(10 ⁻⁵) 3 (10 ⁻⁴) 14	(10 ⁻⁴) 6 (10 ⁻⁵) 3	(10 ⁻⁵) 2 (10 ⁻⁴) 14	(10 ⁻³) 17

	42 (K _r) K ¹ R MRSA	48 (K _i) K=R MRSA	53 (K _i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K _r) K ¹ R MRSA	72 (K _r) K ¹ R MRSA	78 (K _i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	(10 ⁻⁷) 2 (10 ⁻⁶) 52	(10 ⁻⁷) 6	(10 ⁻⁶) 2 (10 ⁻⁷) 5	(10 ⁻⁷) 10	(10 ⁻⁸) 3 (10 ⁻⁷) 26	(10 ⁻⁸) 2 (10 ⁻⁷) 7	(10 ⁻⁷) 1 (10 ⁻⁶) 4	(10 ⁻⁶) 10
Stęż. końc I	(10 ⁻⁵) 21	(10 ⁻⁴) 7	(10 ⁻⁵) 1 (10 ⁻⁴) 5	(10 ⁻⁴) 4	(10 ⁻⁵) 7	(10 ⁻²) 68 (10 ⁻³) 3	(10 ⁻⁴) 2 (10 ⁻³) 22	(10 ⁻⁴) 6
Stęż. końc.II	(10 ⁻⁵) 6	(10 ⁻⁴) 5	(10 ⁻³) 38	(10 ⁻⁴) 3 (10 ⁻³) 38	(10 ⁻⁵) 5	(10 ⁻³) 7	(10 ⁻⁴) 11	(10 ⁻⁴) 2 (10 ⁻³) 8

Tab. 85 Stężenie początkowe i końcowe- ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* przy rozcieńczeniu 10⁰ – 10⁹ – komórki endotelialne.

	1 (O) O=K MRSA	3 (R) R¹K MSSA	4 (K_r) K¹R MSSA	5 (K_i) K=R MRSA	8 (K_r) K¹R MRSA
Stęż. pocz.	3.75×10^8	4.15×10^8	1.8×10^8	8×10^8	3.5×10^8
Stęż. końc. I	3×10^7	1.37×10^5	2.25×10^7	4.75×10^6	1×10^8
Współ. il. - Stęż. pocz./stęż.k ońc.	0.8×10^{-1}	0.33×10^{-3}	1.25×10^{-1}	0.6×10^{-2}	0.3
Współ. il. śr.($\times 10^3$)	0.8×10^2	0.33	1.25×10^2	0.6×10^1	0.3×10^3
Współ. il. średni ($\times 10^3$)	80	0.33	125	6	300
Stęż. końc. II	5×10^6	5.5×10^5	5.5×10^7	7×10^7	1.1×10^7
Współ. il. - Stęż. pocz./stęż.k ońc.	1.3×10^{-2}	1.32×10^{-3}	3.05×10^{-1}	0.88×10^{-1}	0.31×10^{-1}
Współ. il. ($\times 10^3$)	1.3×10^1	1.32	3.05×10^2	0.88×10^2	0.31×10^2
Współ. il. śr. ($\times 10^3$)	13	1.32	305	88	31

Tab. 86 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych – komórki endotelialne.

	12 (K _i) K=R MRSA	20 (K _i) K=R MRSA	26 (K _i) K=R MRSA	42 (K _i) K ¹ R MRSA	48 (K _i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	1.3x 10 ⁹	6x 10 ⁸	1.3x 10 ⁹	3.6x 10 ⁸	6x 10 ⁸
Stęż. końc. I	2 x 10 ⁵	1.05x 10 ⁸	1.55x 10 ⁵	1.05 x 10 ⁸	3.5x 10 ⁶
Współ. il. -stęż. pocz./stęż. końc.	1.53x 10 ⁻⁴	0.17	1.2x 10 ⁻⁴	0.3	0.58x 10 ⁻²
Współ. il. (x10 ³)	1.53x 10 ⁻¹	0.17x10 ³	1.2x 10 ⁻¹	0,3 x 10 ³	0,58 x 10 ¹
sr. współ. il. (x10 ⁵)	0.153	170	0.12	300	5.8
Stęż. końc. II	9x 10 ⁶	8.5x 10 ⁶	8.5x 10 ⁵	3x 10 ⁷	2.5x 10 ⁶
Współ. il.	6.92x 10 ⁻³	1.41x 10 ⁻²	6.53x 10 ⁻⁴	0.98x 10 ⁻¹	0.41x 10 ⁻²
Współ. il. (x10 ³)	6.92	1.41x 10 ¹	6.53x 10 ⁻¹	0.98x 10 ²	0.41x 10 ¹
sr. współ. il. (x10 ³)	6.92	14.1	0.653	98	4.1

Tab. 87 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych – komórki endotelialne c.d.

	53 (K_i) K=R MRSA	58 (R) R=K=O MRSA	59 (O) R=K=O MRSA	63 (K_r) K¹R MRSA	72 (K_r) K¹R MRSA	78 (K_i) K=R MRSA
Stęż. pocz.	1.25× 10 ⁹	1× 10 ⁹	2.8× 10 ⁹	1.35× 10 ⁹	7× 10 ⁷	1× 10 ⁸
Stęż. końc. I	3.75× 10 ⁶	2× 10 ⁶	3.5× 10 ⁷	2.45× 10 ⁵	1.05× 10 ⁶	3× 10 ⁶
Współ. il.-stęż. pocz./st. końc.	3× 10 ⁻³	2× 10 ⁻³	1.25× 10 ⁻²	1.81× 10 ⁻⁴	0.15× 10 ⁻¹	3× 10 ⁻²
Współ. il. (×10 ³)	3	2	1,25 × 10 ¹	1,81 × 10 ⁻¹	0,15× 10 ²	3 × 10 ¹
sr. współ. il. (×10 ³)	3	2	12.5	0.181	15	30
Stęż. końc. II	1.9× 10 ⁵	1.7× 10 ⁶	2.5× 10 ⁷	3.5× 10 ⁵	5.5× 10 ⁶	7× 10 ⁵
Współ. ilościowy	1.52× 10 ⁻⁴	1.7× 10 ⁻³	0.9× 10 ⁻²	2.6× 10 ⁻⁴	0.78× 10 ⁻¹	7× 10 ⁻³
Współ. (×10 ³)	1.52× 10 ⁻¹	1,7	0.9× 10 ¹	2.6× 10 ⁻¹	0.78× 10 ²	7
sr. współ. (×10 ³)	0.152	1.7	9	0.26	78	7

Tab. 88 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S.aureus* (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych – komórki endotelialne c.d.

Tab. 89 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne – komórki endotelialne.

I			II		
Lp	nr szczepu	śr. współczynnik	Lp	nr szczepu	śr. współczynnik
1	8	300	1	4	305
2	42	300	2	42	98
3	20	170	3	5	88
4	4	125	4	72	78
5	1	80	5	8	31
6	78	30	6	20	14,1
7	72	15	7	1	13
8	59	12,5	8	59	9
9	5	6	9	78	7
10	48	5,8	10	12	6,92
11	53	3	11	48	4,1
12	58	2	12	58	1,7
13	3	0,33	13	3	1,32
14	63	0,181	14	26	0,653
15	12	0,153	15	63	0,26
16	26	0,12	16	53	0,152

Szczepy	
najbardziej inwazyjne	najmniej inwazyjne
4, 42	3, 26, 63

Tab 90. Wyselekcjonowane szczepy kliniczne - najbardziej i najmniej inwazyjne szczepy komórki endotelialne.

W doświadczeniu zaobserwowano inwazję wyselekcjonowanych szczepów klinicznych do komórek endotelialnych.

Inwazja gronkowców na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 10^7 - 10^9 CFU/ml.

Do najbardziej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórek endotelialnych należą szczepy nr: 4 (K_r , $K \neq R$), 42 (K_r , $K \neq R$).

Do najmniej inwazyjnych szczepów gronkowcowych po inkubacji z komórkami Caco-2 należą szczepy nr: 3 (R , $K \neq R$), 26 (K_i , $K = R$), 63 (K_r , $K \neq R$).

4.10 Ocena wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych - genistyny (GS) na inwazję *Staphylococcus aureus* typu dzikiego (25923), mutantą (10832) z ATCC oraz *Salmonella enteritidis* (kom. Caco-2 10-11 PC).

W doświadczeniu przeprowadzono preinkubację z genistyną, która powinna zahamować inwazję *S. aureus* typu dzikiego WT oraz mutantą MT, natomiast nie powinna wpłynąć na efektywność inwazji *S. enteritidis*, która stanowi pozytywną kontrolę.

Rodzaj szczepu	Kontrola		WT	
	- GS (25 μ M)	+ GS	- GS	+ GS
Stęż. końc. po dod. + gent. (100 μ g/ml)	1) 0	3) 0	7) (10^{-3}) 1	9) 0
	2) 0	4) 0	8) (10^{-1}) 6	10) 0
Stęż. końc. bez dod. gent. - gent.	5) 0		11) (10^{-5}) 44	
	6) 0		12) (10^{-5}) 34	

Rodzaj szczepu	MT		S1400	
	- GS (25 μ M)	+ GS	- GS	+ GS
Stęż. końc. po dod. + gent. (100 μ g/ml)	13) (10^{-1}) 4	15) 0	19) (10^{-5}) 1	21) (10^{-5}) 1
	14) (10^{-1}) 2	16) 0	20) (10^{-5}) 1	22) (10^{-5}) 2
Stęż. końc. bez dod. gent. - gent.	17) (10^{-5}) 30		23) (10^{-5}) 88	
	18) (10^{-5}) 42		24) (10^{-5}) 68	

Tab. 91 Ilość koloni szczepów WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} w doświadczeniu z genistyną.

Stężenie początkowe:

Ilość kolonii WT przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 3 kolonie, WT = 3×10^8 CFU/ml

Ilość kolonii MT przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 2 kolonie, MT = 2×10^{10} CFU/ml

Ilość kolonii S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 2 kolonie, S1400 = 2×10^{10} CFU/ml

Rodzaj szczepu	Kontrola		WT	
	- GS (25 μ M)	+ GS	- GS	+ GS
Stęż. końc. po dod. + gent. (100 μ g/ml)	7) 0 8) 0	9) 0 10) 0	7) 5×10^4 8) 3×10^3	9) 0 10) 0
Stęż. końc. bez dod. gent. - gent.	11) 0 12) 0		11) $2,2 \times 10^8$ 12) $1,7 \times 10^8$	

	MT		S1400	
	- GS (25 μ M)	+ GS	- GS	+ GS
Stęż. końc. po dod. + gent. (100 μ g/ml)	13) 2×10^3 14) 1×10^3	15) 0 17) 0	19) 5×10^6 20) 5×10^6	21) 5×10^6 22) 1×10^7
Stęż. końc. bez dod. gent. - gent.	17) $1,5 \times 10^8$ 18) $2,1 \times 10^8$		23) $4,4 \times 10^8$ 24) $3,4 \times 10^6$	

Tab. 92 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w doświadczeniu z genistyną. Zaznaczono wpływ genistyny na stężenie końcowe szczepów.

Preinkubacja komórek z inhibitorem kinaz tyrozynowych – genistyny uniemożliwiła inwazję gronkowców WT i MT do komórek Caco-2, natomiast genistyna nie wpłynęła na inwazję *S. enteritidis*. Inwazja *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 2×10^{10} CFU/ml. Szczep *S. enteritidis* dokonał inwazji na komórki epitelialne osiągając stężenie 10^6 - 10^7 CFU/ml.

Zaobserwowano również adherencję szczepów: *S. aureus* WT, MT i *S. enteritidis* S1400. Adherencja nastąpiła przy stężeniu: 3×10^8 CFU/ml dla WT, 2×10^{10} CFU/ml dla MT i S1400. Na powierzchni komórek pozostało 10^8 CFU/ml dla wszystkich szczepów (WT, MT, S1400).

4.11 Ocena wyników badania translokacji bakteryjnej *Staphylococcus aureus*: typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i *Salmonella enteritidis* oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.

Badanie translokacji bakteryjnej *Staphylococcus aureus*: typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i *Salmonella enteritidis* (kom. Caco-2 – 5-6 PC).

Translokacja bakteryjna powinna przebiegać odmiennie u trzech w/w szczepów. Typ dziki WT(25923), w związku z jego małą inwazyjnością powinien mieć jak najmniejsze predyspozycje do translokacji, mutant MT (10832) z kolei, nie posiada białka A w warstwie peptydoglikanu, więc w ogóle nie powinien ulegać translokacji, natomiast *Salmonella enteritidis* (S1400) ulega jak najbardziej translokacji bakteryjnej i w kolejnych doświadczeniach stanowi pozytywną kontrolę.

Rodzaj szczepu	Kontrola			S1400		
	1	2	3	4	5	6
Górna komora – stęż. końc.	0	0	0	(10 ⁻⁵) 10	(10 ⁻⁵) 18	(10 ⁻⁵) 14
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	(10 ⁻⁵) 4	(10 ⁻¹) 12 (10 ⁻²) 1	(10 ⁻⁴) 4

Rodzaj szczepu	WT			MT		
	7	8	9	10	11	12
Górna komora – stęż. końc.	(10 ⁻⁵) 7	(10 ⁻⁵) 17	(10 ⁻⁵) 21	(10 ⁻⁵) 14	(10 ⁻⁵) 16	(10 ⁻⁵) 25
Dolna komora – stęż. końc.	(10 ⁰) 4	0	(10 ⁰) 6	(10 ⁻²) 6	(10 ⁰) 6	0

Tab. 93 Ilość koloni bakt. WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu 10⁻¹ – 10⁻⁵ w translokacji bakteryjnej.

Stężenie początkowe:

Ilość kolonii WT przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 2 kolonie, WT = 2×10^{10} CFU/ml

Ilość kolonii MT przy rozcieńczeniu 10^{-8} – 1 kolonia , MT = 1×10^{10} CFU/ml

Ilość kolonii S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 9 kolonie, S1400 = $0,9 \times 10^{10}$ CFU/ml

Rodzaj szczepu	Kontrola			S1400		
	1	2	3	4 ($0,9 \times 10^{10}$)	5 ($0,9 \times 10^{10}$)	6 ($0,9 \times 10^{10}$)
Nr (stęż. począk. – CFU/ml)						
Górna komora – stęż. końc.	0	0	0	5×10^7	$0,9 \times 10^8$	7×10^7
Współ. il. – Stęż. końc./stęż. począk.	0	0	0	$5,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-2}	$7,7 \times 10^{-3}$
Współ. il. ($\times 10^8$)	0	0	0	$5,5 \times 10^5$	1×10^6	$7,7 \times 10^5$
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	2×10^7	5×10^3	2×10^5
Współ. il.	0	0	0	$2,2 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-5}$
Współ. il. ($\times 10^8$)	0	0	0	$2,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^1$	$2,2 \times 10^3$

Rodzaj szczepu	WT			MT		
	7 (2×10^{10})	8 (2×10^{10})	9 (2×10^{10})	10 (1×10^{10})	11 (1×10^{10})	12 (1×10^{10})
Górna komora – stęż. końc.	$3,5 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$1,05 \times 10^8$	7×10^7	8×10^7	$1,25 \times 10^8$
Współ. il. – Stęż. końc./stęż. począk.	$1,75 \times 10^{-3}$	$4,25 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-2}$	7×10^{-3}	8×10^{-3}	$1,25 \times 10^{-2}$
Współ. il. ($\times 10^8$)	$1,75 \times 10^5$	$4,25 \times 10^5$	$0,5 \times 10^6$	7×10^5	8×10^5	$1,25 \times 10^6$
Dolna komora – stęż. końc.	2×10^2	0	3×10^2	3×10^4	3×10^2	0
Współ. il.	1×10^{-8}	0	$1,5 \times 10^{-8}$	3×10^{-6}	3×10^{-8}	0
Współ. il. ($\times 10^8$)	1	0	1,5	3×10^2	3	0

Tab. 94 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.

Zaobserwowano zjawisko adherencji i translokacji bakteryjnej *S. aureus* WT, MT S1400 przy stężeniu 10^{10} CFU/ml.

Większość komórek bakteryjnych pozostało na powierzchni kom. Caco-2, natomiast wielokrotnie mniej było zdolnych do przemieszczenia się pomiędzy lub przez komórki epitelialne Caco-2.

Na powierzchni komórek Caco-2 pozostało 10^7 - 10^8 CFU/ml S1400, WT i MT, natomiast 10^3 - 10^7 CFU/ml S1400, 10^2 CFU/ml WT, 10^2 - 10^4 CFU/ml MT uległo translokacji bakteryjnej.

Największe predyspozycje do translokacji bakteryjnej posiada *Salmonella enteritidis* (pozytywna kontrola), następnie *S. aureus* - MT, mutant oraz typ dziki WT.

Translokacja bakteryjna

S1400 > MT > WT

Zaskakujący jest wynik, że *S. aureus* - MT, mutant posiada większe predyspozycje do translokacji od typu dzikiego WT, gdyż to by świadczyło o tym, że nie białko A odgrywa istotną rolę w procesie translokacji tylko inny nieznan czynnik.

Dalsze doświadczenia powinny potwierdzić tę hipotezę.

Badanie translokacji bakteryjnej *Staphylococcus aureus*: typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i *Salmonella enteritidis* (kom. Caco-2 – 18-19 PC).

Rodzaj szczepu	Kontrola			S1400		
	1	2	3	4	5	6
Górna komora – stęż. końc.	0	0	0	(10^{-5}) 7	(10^{-5}) 7	(10^{-5}) 11
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	0	0	0
Rodzaj szczepu	WT			MT		
Nr	7	8	9	10	11	12
Górna komora – stęż. końc.	(10^{-5}) 14	(10^{-5}) 5	(10^{-5}) 1	(10^{-5}) 11	(10^{-5}) 1	(10^{-5}) 10
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	0	0	(10^0) 60

Tab. 95 Ilość koloni bakt. WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} w translokacji bakteryjnej.

Stężenie początkowe:

Ilość kolonii WT przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 3 kolonie, WT = $1,5 \times 10^9$ CFU/ml

Ilość kolonii MT przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 1 kolonia, MT = 5×10^8 CFU/ml

Ilość kolonii S1400 przy rozcieńczeniu 10^{-7} – 3 kolonie, S1400 = $1,5 \times 10^9$ CFU/ml

Rodzaj szczepu	K			S1400		
	1	2	3	4 ($1,5 \times 10^9$)	5 ($1,5 \times 10^9$)	6 ($1,5 \times 10^9$)
Nr (stęż. począk. – CFU/ml)						
Górna komora – stęż. końc.	0	0	0	$3,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	0	0	0

Rodzaj szczepu	WT			MT		
	7 ($1,5 \times 10^9$)	8 ($1,5 \times 10^9$)	9 ($1,5 \times 10^9$)	10 (1×10^{10})	11 (1×10^{10})	12 (1×10^{10})
Górna komora – stęż. końc.	7×10^7	4×10^7	5×10^6	$5,5 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	5×10^7
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	0	0	3×10^3

Tab. 96 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.

Zaobserwowano zjawisko adherencji *S. aureus* WT, MT S1400 przy stężeniu 10^8 - 10^9 CFU/ml oraz translokację bakteryjną tylko w przypadku *S. aureus* MT.

(3×10^3 CFU/ml). Stężenie 10^9 CFU/ml dla S1400 i WT nie było wystarczające do rozpoczęcia procesu translokacji, natomiast dla MT już 10^8 CFU/ml było stężeniem wystarczającym.

Poza tym do eksperymentu użyto komórki, które znajdowały się w stadium 18-19 PC, przez to komórki miały utrudnione zadanie przedostania się przez wiele warstw komórek Caco-2.

Badanie translokacji bakteryjnej *Staphylococcus aureus*: typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i *Salmonella enteritidis* (kom. Caco-2 – 7-8 PC, Transwell poliestrowe - WT, MT, S1400 i poliwęglowe – kontrola, WT, MT).

Płytko wielodołkowa, dwukomorowa (Transwell poliestrowe)

Rodzaj szczepu	WT	WT	MT	MT	S1400	S1400
Nr	1	2	3	4	5	6
Górna komora – stęż. końc.	(10 ⁻⁵) 42	(10 ⁻⁵) 47	(10 ⁻⁵) 38	(10 ⁻⁵) 24	(10 ⁻⁵) 9	(10 ⁻⁵) 8
Dolna komora – stęż. końc.	0	(10 ⁻¹) 8	0	(10 ⁻¹) 13	0	0

Płytko wielodołkowa, dwukomorowa (Transwell poliwęglowe)

Rodzaj szczepu	K	K	WT	WT	MT	MT
Nr	7	8	9	10	11	12
Górna komora – stęż. końc.	0	0	(10 ⁻⁵) 23	(10 ⁻⁵) 45	(10 ⁻⁵) 17	(10 ⁻⁵) 13
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0	(10 ⁰) 28	0	(10 ⁰) 9

Tab. 97 Ilość koloni bakt. WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu 10⁰ – 10⁻⁵ w translokacji bakteryjnej (Transwell poliestrowe i poliwęglowe).

Stężenie początkowe:

Ilość kolonii WT przy rozcieńczeniu 10⁻⁸ – 1 kolonia, WT = 1 × 10¹⁰ CFU/ml

Ilość kolonii MT przy rozcieńczeniu 10⁻⁸ – 1 kolonia, MT = 1 × 10¹⁰ CFU/ml

Ilość kolonii S1400 przy rozcieńczeniu 10⁻⁷ – 4 kolonie, S1400 = 4 × 10⁸ CFU/ml

Płytki wielodołkowa, dwukomorowa (Transwell poliestrowe)

	WT	WT	MT	MT	S1400	S1400
Nr (stęż. początk. CFU/ml)	1) 1×10^{10}	2) 1×10^{10}	3) 1×10^{10}	4) 1×10^{10}	5) 4×10^8	6) 4×10^8
Górna komora	$2,1 \times 10^8$	$2,35 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	4×10^7
Współ. il. – stęż. końc/stęż. początk.	$2,1 \times 10^{-2}$	$2,35 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}
Współ. il. ($\times 10^7$)	$2,1 \times 10^5$	$2,35 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	WT	WT	MT	MT	S1400	S1400
Dolna komora	0	4×10^3	0	$6,5 \times 10^3$	0	0
Współ. il. – stęż. końc/stęż. początk.	0	4×10^{-7}	0	$6,5 \times 10^{-7}$	0	0
Współ. il. ($\times 10^7$)	0	4	0	6,5	0	0

Płytki wielodołkowa, dwukomorowa (Transwell poliwęglowe)

	K	K	WT	WT	MT	MT
Nr (stęż. początk. CFU/ml)	7)	8)	9) 1×10^{10}	10) 1×10^{10}	11) 1×10^{10}	12) 1×10^{10}
Górna komora	0	0	$1,5 \times 10^8$	$2,25 \times 10^8$	$8,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
Współ. il. – stęż. końc/stęż. początk.	0	0	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,25 \times 10^{-2}$	$8,5 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-3}$
Współ. il. ($\times 10^7$)	0	0	$1,5 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$
Dolna komora	0	0	0	$1,4 \times 10^3$	0	2×10^3
Współ. il. – stęż. końc/stęż. początk.	0	0	0	$1,4 \times 10^{-7}$	0	2×10^{-7}
Współ. il. ($\times 10^7$)	0	0	0	1,4	0	2

Tab. 98 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej (Transwell poliestrowe i poliwęglowe).

Zaobserwowano zjawisko adherencji bakteryjnej *S. aureus* WT, MT S1400 przy stężeniu 10^{10} CFU/ml dla WT i MT i 10^8 CFU/ml dla S1400.

Na powierzchni komórek Caco-2 pozostało 10^7 CFU/ml S1400 oraz 10^7 - 10^8 CFU/ml WT i MT. Największe predyspozycje do adherencji ma *S. enteritidis*, następnie WT oraz MT.

Zaobserwowano również zjawisko translokacji bakteryjnej u szczepów *S. aureus* WT, MT przy w/w stężeniu, natomiast stężenie 10^8 CFU/ml dla S1400 nie było wystarczające do rozpoczęcia procesu translokacji.

10^3 CFU/ml kom. bakt. WT i MT uległo translokacji bakteryjnej, z tym że szczep MT wykazywał silniejszą tendencję do przemieszczenia się pomiędzy lub przez kom. Caco-2.

Translokacja bakteryjna

MT > WT

Typ naczyń hodowlanych użytych w doświadczeniu, a ściślej ich składniki, z których zostały wytworzone nie wpłynął na wynik doświadczenia.

Podsumowanie

Translokacja bakteryjna dla szczepów: *S. enteritidis* (S1400), *S. aureus* (WT) i (MT) następowała przy stężeniu 10^{10} CFU/ml oraz 10^8 CFU/ml dla MT, natomiast nie następowała przy stężeniu 10^9 CFU/ml dla WT oraz 10^8 – 10^9 CFU/ml dla S1400. Wg w/w przeprowadzonych doświadczeń wynika, że *S. aureus* (MT) wykazywał największe tendencje do translokacji bakteryjnej, większe nawet od szczepu *S. enteritidis* (S1400), który wymagał wyższego stężenia do procesu translokacji.

Badanie translokacji bakteryjnej wyselekcjonowanych szczepów klinicznych:

4, 5, 8, 20, 53, 59 (kom. Caco-2 – 16-17 PC), dwie próby (a, b).

Nr szczepu	4 K _r (K ¹ R)	5 K _i (K=R)	8 K _r (K ¹ R)
Stężenie początk.	(10 ⁻⁷) 40	(10 ⁻⁸) 5	(10 ⁻⁷) 6
Górna komora – stęż. końc.	a) (10 ⁻⁵) 42 b) (10 ⁻³) 3	a) (10 ⁻⁵) 60 b) (10 ⁻⁵) 80	a) (10 ⁻³) 6 b) (10 ⁻³) 3
Dolna komora – stęż. końc.	0	a) (10 ⁰) 8 (10 ⁻¹) 1	0

Nr szczepu	20 K _i (K=R)	53 K _i (K=R)	59 O (K=R=O)
Stężenie początk.	(10 ⁻⁸) 2	(10 ⁻⁶) 23	(10 ⁻⁷) 3
Górna komora – stęż. końc.	a) (10 ⁻⁴) 6 b) (10 ⁻²) 5	a) (10 ⁻⁵) 22 b) (10 ⁻⁵) 34	a) (10 ⁻⁵) 120 b) (10 ⁻⁵) 150
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0

Tab. 99 Ilość koloni bakt. wyselekcjonowanych szczepów klinicznych przy rozcieńczeniu 10⁰– 10⁻⁸ w translokacji bakteryjnej.

Nr szczepu	4 K _r (K ¹ R)	5 K _i (K=R)	8 K _r (K ¹ R)
stęż. początk. (CFU/ml)	2 × 10 ¹⁰	2,5 × 10 ¹⁰	3 × 10 ⁹
Górna komora – Stęż. końc.	a) 9 × 10 ⁷ b) 1,5 × 10 ⁵	a) 3 × 10 ⁸ b) 4 × 10 ⁸	a) 3 × 10 ⁵ b) 1,5 × 10 ⁵
Współ. il. Stęż. końc./stęż. początk.	a) 4,5 × 10 ⁻³ b) 0,75 × 10 ⁻³	a) 1,2 × 10 ⁻² b) 1,6 × 10 ⁻²	a) 1 × 10 ⁻⁴ b) 0,5 × 10 ⁻⁴
Współ. il. (×10 ⁵)	a) 4,5 × 10 ² b) 0,75	a) 1,2 × 10 ³ b) 1,6 × 10 ³	a) 1 × 10 ¹ b) 0,5 × 10 ¹
Współ. il. (śr)	225	1400	7,5
Dolna komora – stęż. końc.	0	a) 5 × 10 ²	0

Tab. 100 Stężenie końcowe szczepów wyselekcjonowanych szczepów klinicznych (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.

Nr szczepu	20 K _i (K=R)	53 K _i (K=R)	59 O (K=R=O)
stęż. początk. (CFU/ml)	1×10^{10}	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
Górna komora – Stęż. końc.	a) 3×10^6 b) $2,5 \times 10^4$	a) $1,1 \times 10^8$ b) $1,7 \times 10^8$	a) 6×10^8 b) $7,5 \times 10^8$
Współ. il. Stęż. końc/stęż. początk.	a) 3×10^{-4} b) $2,5 \times 10^{-4}$	a) $0,73 \times 10^{-1}$ b) $1,1 \times 10^{-1}$	a) 4×10^{-1} b) 5×10^{-1}
Współ. il. ($\times 10^5$)	a) 3×10^1 b) $2,5 \times 10^{-1}$	a) $0,73 \times 10^4$ b) $1,1 \times 10^4$	a) 4×10^4 b) 5×10^4
Współ. il. (śr)	15	4200	45000
Dolna komora – stęż. końc.	0	0	0

Tab. 100 Stężenie końcowe szczepów wyselekcjonowanych szczepów klinicznych (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.

Zaobserwowano zjawisko inwazji bakteryjnej (dzięki zastosowaniu lizostafiny po inkubacji komórek i bakterii) wyselekcjonowanych szczepów klinicznych (4, 5, 8, 20, 53, 59) przy stężeniu 10^9 - 10^{10} CFU/ml, natomiast nie zaobserwowano translokacji bakteryjnej szczepów klinicznych z wyjątkiem szczepu nr 5 (K_i, K=R). Do najbardziej inwazyjnych szczepów należą szczepy nr: 59 (O; K=R=O), 53 (K_i; K=R), 5 (K_i; K=R), 4 (K_r; K≠R). Do najmniej inwazyjnych szczepów należą szczepy nr: 20 (K_i; K=R) i 8 (K_r; K≠R).

5. DYSKUSJA

Gronkowiec złocisty *Staphylococcus aureus* jest jednym z najczęściej izolowanych drobnoustrojów zarówno w przypadku zakażeń szpitalnych jak i poza szpitalnych (44). Drobnoustrój ten ma wiele mechanizmów zjadliwości, które powodują, że wywołane przez niego zakażenia o ciężkim przebiegu są szczególnie niebezpieczne dla Wiązanie się struktur powierzchniowych gronkowca złocistego z białkami surowicy i tzw. zdrowia i życia pacjentów. białkami zewnątrzkomórkowej macierzy, umożliwia przyleganie komórek bakteryjnych do tkanek żywiciela i ich kolonizację. Wytwarzanie przez *Staphylococcus aureus* dużej liczby produktów poza komórkowo, wykazujących przy tym silne działanie biologiczne o charakterze enzymów i toksyn (katalaza, koagulaza, hemolizyny α , β , δ , enterotoksyny i leukocydyny), pozwala mu łatwo wnikać do organizmu gospodarza, kolonizować tkanki oraz je uszkadzać (91).

Dodatkowym mechanizmem pozwalającym komórkom *Staphylococcus aureus* na utrzymanie się w środowisku szpitalnym jest jego oporność na leki przeciwbakteryjne. Szczepy obecnie izolowane od chorych hospitalizowanych są odporne na większość leków przeciwgronkowcowych, do niedawna jeszcze skutecznych. Ponadto dysponują różnymi kodowanymi chromosomalnie bądź na plazmidach mechanizmami oporności (92).

Jednym z najpoważniejszych problemów klinicznych ostatnich lat są zakażenia, przede wszystkim zakażenia krwi wywołane przez szczepy gronkowca złocistego opornego na metycylinę – MRSA. U chorych oparzonych szczepy MRSA są najczęściej izolowane z krwi, obok pałeczek Gram (-) *Acinetobacter baumannii*, które również charakteryzują się licznymi mechanizmami oporności i niewrażliwością na powszechnie stosowane antybiotyki (57).

Obowiązujące dotychczas teorie zakładały, że pierwotnym ogniskiem zakażenia uogólnionego u chorych po urazie termicznym jest kontaminacja rany oparzeniowej, w jej następstwie dochodzi do zakażenia, a po pokonaniu barier ochronnych mikroorganizmy wnikają do krwioobiegu (12, 46, 99).

Z ostatnich badań jednak wynika, że szczepy wyizolowane z rany oparzeniowej i krwi różniły się pod względem fenotypowym i genotypowym (30). Można założyć, że do zakażenia uogólnionego może dochodzić na innej drodze w wyniku translokacji bakteryjnej.

Źródłem zakażenia w takim przypadku staje się przewód pokarmowy chorych po urazie termicznym.

Hipoteza powyższa, stała się punktem wyjścia do mojej pracy doktorskiej.

W badaniach własnych najczęściej izolowanym gronkowcem był szczep metycylooporny MRSA (62,3%).

Szczepy gronkowcowe wyizolowano głównie z krwi (53,2%), pozostałe uzyskano z ran (40,3% i tylko 5 (6,5%) z odbytu. Wyizolowanie gronkowca z odbytu stało się trudnym zadaniem. Zdecydowano się na jedyną możliwą do wykonania metodę pobrania materiału jakim był głęboki wymaz z odbytu. Do translokacji bakteryjnej dochodzi w jelicie cienkim, krętym, w związku z tym do końcowego odcinka przewodu pokarmowego docierają śladowe ilości komórek bakteryjnych, tym bardziej gronkowca, który nie jest zaliczany do naturalnej mikroflory jelita.

Izolacja gronkowca od chorych po urazie termicznym równocześnie z rany, krwi i odbytu (R-K-O) stała się prawie niemożliwa ze względu na niską liczebność przypadków i trudności w wykonaniu (pacjentów takich znalazło się tylko dwóch).

Wstępne założenie musiało szybko ulec modyfikacji. Najwięcej udało się wyizolować szczepów z rany i krwi (R-K) od 17 pacjentów, z krwi i odbytu (K-O) był tylko jeden przypadek.

Najbardziej idealny układ do badania translokacji bakteryjnej występuje wtedy, gdy stwierdzi się występowanie szczepów niespokrewnionych z krwi i rany oraz potwierdzi się jednocześnie podobieństwo fenotypowe i genotypowe szczepów pochodzących z krwi i jelit.

Wszystkie te układy poddano analizie fenotypowej, genotypowej i zbadano mechanizm translokacji bakteryjnej na wybranych szczepach klinicznych.

W celu analizy fenotypowej szczepów wyizolowanych z rany i krwi porównano ich profile oporności, antybiogramy. Profile oporności były różne u 12 pacjentów (13 antybiogramów – 81,25%) oraz identyczne tylko u 3 pacjentów (18,75%).

W dalszym etapie przeprowadzono analizę genotypową w/w szczepów, która potwierdziła zaobserwowane różnice.

Stwierdzono występowanie szczepów niespokrewnionych z krwi i rany u jednego pacjenta, a także wykazano podobieństwo genotypowe szczepów pochodzących z krwi i jelit.

Powyższe obserwacje stanowiły podstawę do dalszych badań określenia zjadliwości szczepów poprzez zbadanie adherencji, inwazji oraz translokacji bakteryjnej gronkowców *in vitro* przy użyciu komórek epitelialnych i endotelialnych.

Adherencja jest pierwszym etapem translokacji bakteryjnej niezależnie od tego czy translokacja jest transcelularna (przez komórki epitelialne) czy też paracelularna (pomiędzy komórkami). Inwazja z kolei jest etapem pośrednim w translokacji transcelularnej.

W przeprowadzonych doświadczeniach własnych badano adherencję, inwazję i translokację bakteryjną szczepów: *S. aureus* typu dzikiego WT, mutanta MT, które stanowiły szczepy wzorcowe oraz *Salmonella enteritidis* S1400 szczepu używanego jako pozytywna kontrola i wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.

Następnie badano wpływ tych interakcji na akumulację transkryptów cytokin IL-8 i TNF- α oraz wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych na inwazję *S. aureus* (WT, MT). Badanie adherencji i inwazji rozpoczęto od szczepów *Staphylococcus aureus* – typu dzikiego (25923), mutanta (10832) z ATCC, oraz *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2.

Komórki Caco-2 wykorzystane do doświadczenia to komórki nowotworowe, gruczalokoraka ludzkiego okrężnicy (adenocarcinoma), charakteryzują się intensywnymi podziałami komórkowymi i utratą tzw. zahamowania kontaktowego (87).

Komórki Caco-2 są idealnym modelem do badania mechanizmów translokacji bakteryjnej ze względu na podobieństwo do ludzkich enterocytów. Komórki posiadają powierzchnię apikalną i bazolateralną, które odpowiadają powierzchni od strony światła jelita i naczyń krwionośnych. Poza tym w skład komórek Caco-2 wchodzi obwódki zamykające ("tight junctions") oraz rąbek szczoteczkowy ("brush border") (122).

Do pierwszej części badań został wybrany gronkowiec złocisty, typ dziki WT (25923) z ATCC, ze względu na jego uczestnictwo w inwazji na komórki epitelialne.

Zasadniczą rolę w inwazji odgrywa białko A (78).

Białko A jest białkiem powierzchniowym, które jest kowalencyjnie związane z warstwą peptydoglikanu u ponad 90% *S. aureus* (71).

Białko A wiąże region F_c cząsteczek IgG, uniemożliwiając wiązanie swoistych przeciwciał do komórek gronkowców i blokując opsonizację.

Immunoglobuliny związane przez białko A aktywują jednak dopełniacz, co przyczynia się do powstania silnej reakcji zapalnej (71).

Do dalszych badań w celu porównawczym wybrano mutanta MT (10832), który białka A nie posiada.

Adherencja wszystkich szczepów była na podobnym poziomie - 10^8 - 10^{10} CFU/ml, natomiast wystąpiły pewne różnice w inwazji w/w szczepów.

S. enteritidis dokonała inwazji z największą efektywnością, osiągając stężenie – 10^5 - 10^6 CFU/ml, typ dziki i mutant natomiast osiągnął stężenie – 10^3 - 10^4 CFU/ml.

Po zbadaniu adherencji i inwazji na szczepach wzorcowych (WT, MT) i pozytywnej kontroli (S1400) dokonano selekcji szczepów klinicznych. Podstawą selekcji były wyniki analizy genotypowej. Najlepszy układ do badania był wtedy gdy szczepy z krwi i odbytu nie różniły się pod względem genotypowym lub szczepy z krwi i rany były ze sobą niespokrewnione. W związku z tym pod uwagę wzięto szczepy wyizolowane z odbytu (źródło translokacji) oraz krwi gdzie był różny ich wzór restrykcyjny PFGE. W celu porównawczym użyto szczepy gronkowca wyizolowane z krwi, które były identyczne pod względem genotypowym ze szczepami wyizolowanymi z rany.

Inwazję wyselekcjonowanych szczepów klinicznych badano na komórkach epitelialnych i endotelialnych.

Zgodnie z oczekiwaniami największe predyspozycje do inwazji na komórki Caco-2 mają szczepy wyizolowane z odbytu, gdzie wzory restrykcyjne szczepów wyizolowanych z odbytu i krwi jednego pacjenta są identyczne (O=K) oraz szczepy wyizolowane z krwi, które są różne pod względem genotypowym ze szczepem wyizolowanym z rany.

Mimo tego, że *Staphylococcus aureus* jest zaliczany do zewnątrzkomórkowych patogenów (49) to zarówno starsze jak i nowsze badania podważają to twierdzenie. Dostarczają one dowody na internalizację (inwazję) gronkowca złocistego *in vitro* przez komórki, które nie posiadają typowych właściwości fagocytarnych. Do tych komórek można zaliczyć: komórki endotelialne, fibroblasty, osteoklasty, osteoblasty, komórki epitelialne i inne (5, 11, 68, 72, 75, 76, 91, 101, 111).

Przed inwazją do komórki następuje adherencja bakterii (*S. aureus*) do komórki gospodarza dzięki adhezynom MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules), które wiążą się specyficznie z składnikami zewnątrzkomórkowej macierzy: kolagenem, fibrynogenem

i fibronektyną (51, 114). Proces internalizacji do komórki eukariotycznej (linie komórek: nerkowych, endotelialnych, fibroblasty) ułatwia białko wiążące fibronektyną (FnBP- fibronectin-binding protein). Fibronektyna pełni rolę molekularnego pomostu łączącego FnBP z integryną $\alpha_5\beta_1$ na powierzchni ludzkich komórek. (135)

Internalizacja gronkowca złocistego jest możliwa dzięki transdukcji sygnału, uaktywnieniu kinaz tyrozynowych oraz reorganizacji cytoszkieletu (45).

S. aureus, który uległ internalizacji jest otoczony błoną komórkową i jest zamknięty w wakuoli. Ruch wewnątrz komórki gospodarza jest możliwy dzięki polimeryzacji aktyny (90). Niektóre bakterie potrafią przedostać się z fagosomu do cytoplazmy, powodując lizę endosomalnej błony wakuoli (11). Gronkowiec złocisty wewnątrz komórki jest zdolny do replikacji i po zakończonym procesie powoduje apoptozę komórek epitelialnych płuc (79).

Internalizacja *S. aureus* do komórek endotelialnych powoduje uwalnianie się interleukin takich jak: IL-1, IL-6, IL-8 (150).

Z kolei internalizacja *S. aureus* do typowych komórek fagocytarnych takich jak neutrofile przyczynia się do rozwoju zakażenia (29, 64).

Badania *in vitro* już z lat '50 i '60 dowodzą, że gronkowiec złocisty może przeżyć w neutrofilach bardzo długi okres czasu (80, 100, 128).

Następnym etapem badań własnych po inwazji *S. aureus* na komórki epitelialne było sprawdzenie czy dochodzi również do inwazji wyselekcjonowanych szczepów klinicznych *S. aureus* na komórki endotelialne.

W doświadczeniu zaobserwowano inwazję wyselekcjonowanych szczepów klinicznych do komórek endotelialnych (normal human dermal microvascular endothelial cells).

Inwazja gronkowców na komórki następowała przy stężeniu 10^7 - 10^9 CFU/ml i dokonana była przez szczepy *S. aureus* wyizolowane krwi, które były niespokrewnione ze szczepami rany.

W kolejnym etapie badań własnych określano wpływ interakcji pomiędzy komórkami epitelialnymi i szczepami *S. aureus* (typ dziki WT i mutant MT) na akumulację transkryptów cytokin IL-8 i TNF- α w zależności od stężenia komórek bakteryjnych i czasu trwania inkubacji.

Badania prowadzono na komórkach, które były na różnych etapach hodowli.

Komórki, tworzyły pojedynczą, jednolitą warstwę komórek (monolayer).

W momencie kiedy komórki zetknęły się ze sobą błonami komórkowymi powstawały agragaty komórkowe – to stadium nazwano “confluent cells” (CC).

Używano nazwy angielskiej określającej to stadium, ze względu na mało precyzyjne tłumaczenie na język polski. “Confluent” oznacza zbiegający, zlewający się”.

Kolejne etapy hodowli różniły się między sobą stopniem agregacji i wiekiem komórek, etap ten nazwano “post confluent cells” (po etapie “confluent cells”) (PC).

W literaturze angielskiej również używa się tego określenia - “mature, confluent enterocytes” (70).

Komórki Caco-2 wykorzystano w różnych stadiach przy “Ocenie akumulacji transkryptów cytokin IL-8 i TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym typem dzikim WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych” .

Cytokiny wybrane do eksperymentu IL-8 i TNF- α należą do cytokin prozapalnych.

Pojawiają się one w wyniku odpowiedzi na zakażenie uszkodzonych tkanek (65).

TNF- α uczestniczy w inicjacji zapalenia, natomiast IL-8 w czasie podtrzymywania zapalenia (65).

Ponadto oparzenie z zakażeniem (model zwierzęcy) powoduje zwiększenie poziomu wątrobowego mRNA dla TNF- α (97). Zakażenie bakteryjne jest konieczne do indukcji TNF- α mRNA (124).

Nie jest jasne, czy mikroorganizmy z rany oparzeniowej, czy bakterie w procesie translokacji powodują zwiększenie poziomu wątrobowego mRNA dla TNF- α (77).

Ocenie akumulacji transkryptów cytokin służy metoda RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) dzięki niej wykryto podstawowy poziom transkryptu cytokin : IL-8 i TNF- α oraz zaobserwowano jego przyrost w komórkach stymulowanych.

Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że zaobserwowano tendencję malejącą w przyroście transkryptu cytokin IL-8 i TNF- α zarówno dla komórek w stadium CC jak i PC.

Najwyższa akumulacja transkryptów następowała dla największych stężeń komórek bakteryjnych. Dla komórek w stadium PC stężenie bakterii: 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml było

sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji, natomiast dla komórek w stadium CC już stężenie 10^6 było sygnałem wystarczającym do rozpoczęcia transkrypcji.

Kolejnym etapem badań własnych było porównanie akumulacji transkryptów IL-8 i TNF- α u gronkowca, typu dzikiego WT i mutantu MT (10832) z ATCC po 2-3 godzinnej inkubacji z komórkami Caco-2.

Gronkowiec MT nie posiada białka powierzchniowego A, charakterystycznego dla *S. aureus*.

Z powyższych badań wynika, że szczep gronkowca złocistego nie posiadający białka A wywoływał akumulację transkryptu IL-8 i TNF- α przy niższym stężeniu niż typ dziki WT. Dolną granicą dla szczepu dzikiego WT w pierwszym przypadku było stężenie 10^7 CFU/ml, dla mutantu – 10^6 oraz w drugim przypadku: dla WT 10^8 i MT 10^7 .

Zatem produkcja cytokin IL-8 i TNF- α po wpływie szczepu MT nie była uzależniona od białka A tylko od innego czynnika.

Dalszym etapem tej części badań własnych była ocena akumulacji transkryptów cytokin po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym typem dzikim WT w zależności od czasu trwania inkubacji. Wyjściowe stężenie komórek bakteryjnych 10^{12} CFU/ml.

W komórkach Caco-2 po 1, 2, 3 i 4 godzinnej inkubacji z gronkowcem złocistym WT transkrypcja IL-8 i TNF α była szybka i prowadziła do akumulacji mRNA.

Zaobserwowano najwyższy przyrost transkryptów po upływie 4 godz. i najniższy po 1 godz. inkubacji.

Dla IL-8 i TNF- α transkrypcja była znacznie szybsza po upływie 3 godz w porównaniu z 1 godz. po inkubacji z gronkowcem WT.

Podsumowując doświadczenie z akumulacją transkryptu cytokin IL-8 i TNF- α można stwierdzić, że transkrypcja cytokin w komórkach Caco-2 odbywa się na pewien określony sygnał, w tym przypadku była to inwazja czy adherencja gronkowca do komórek epitelialnych.

Nie jest obojętne ani stężenie ani typ gronkowca (WT, MT) używanego do inkubacji. Zazwyczaj wyższe stężenie indukuje produkcję cytokin IL-8 i TNF- α 10^9 - 10^7 a nawet 10^{12} dla WT, a dla mutantu wystarczy nawet 10^6 CFU/ml.

W miarę obniżania stężenia gronkowca zarówno typu dzikiego WT jaki i mutantu MT obserwuje się tendencję malejącą. Niskie stężenie 10^5 - 10^1 jest niewystarczające do rozpoczęcia transkrypcji cytokin.

Czas inkubacji również odgrywa rolę w odpowiedzi na infekcję bakteryjną, w miarę upływu czasu wzrasta poziom mRNA dla IL-8 i TNF- α , również zaobserwowano tendencję rosnącą.

Jak już wspomniałam wcześniej w procesie inwazji (internalizacji) *S. aureus* podstawową rolę odgrywają kinazy tyrozynowe, które zapoczątkowują cały proces (2).

Następne doświadczenie z badań własnych potwierdziło w/w stwierdzenie.

Preinkubacja komórek z inhibitorem kinaz tyrozynowych – genistyny uniemożliwiła inwazję gronkowców WT i MT do komórek Caco-2, natomiast genistyna nie wpłynęła na inwazję *S. enteritidis*. Inwazja *Salmonella enteritidis* na komórki Caco-2 następowała przy stężeniu 2×10^{10} CFU/ml. Szczep *S. enteritidis* dokonał inwazji na komórki epitelialne osiągając wysokie stężenie 10^6 - 10^7 CFU/ml.

Kolejnym etapem moich badań własnych była część poświęcona translokacji bakteryjnej: *Staphylococcus aureus*: typu dzikiego (25923), mutantu (10832) z ATCC i *Salmonella enteritidis* (S1400) oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.

Translokacja bakteryjna dla szczepów: *S. enteritidis* (S1400), *S. aureus* (WT) i (MT) następowała przy stężeniu 10^{10} CFU/ml oraz 10^8 CFU/ml dla MT, natomiast nie następowała przy stężeniu 10^9 CFU/ml dla WT oraz 10^8 – 10^9 CFU/ml dla S1400. Wg w/w przeprowadzonych doświadczeń wynika, że *S. aureus* (MT) wykazywał największe tendencje do translokacji bakteryjnej, większe nawet od szczepu *S. enteritidis* (S1400), który wymagał wyższego stężenia do procesu translokacji.

Następnie badano translokację bakteryjną najbardziej i najmniej inwazyjnych wyselekcjonowanych szczepów klinicznych.

Zaobserwowano zjawisko inwazji bakteryjnej (dzięki zastosowaniu lizostafiny po inkubacji komórek i bakterii) wyselekcjonowanych szczepów klinicznych przy stężeniu 10^9 - 10^{10} CFU/ml, natomiast nie zaobserwowano translokacji bakteryjnej

szczepów klinicznych z wyjątkiem jednego szczepu nr 5 (K_i, K=R). Zastosowanie lizostafiny, a także komórek w stadium 16-17 dni PC, mogło uniemożliwić zajście translokacji bakteryjnej. Lizostafina wyeliminowała bakterie z powierzchni jednolitej, warstwy komórek Caco-2 (monolayer), co uniemożliwiło przedostanie pomiędzy komórkami do dolnej komory płytki wielodołkowej-dwukomorowej.

Ponadto nie zaobserwowano translokacji bakteryjnej ze względu na stadium komórek Caco-2, w którym się one znajdowały -16-17 dni PC "post confluent", być może komórki bakteryjne nie mogły przedostać się przez wielowarstwowość komórek Caco-2 oraz osiągniętą wysoką gęstość komórkową uzyskaną po stadium "confluent cells" (CC).

Ale najbardziej prawdopodobne jest to, że nie zaobserwowano translokacji bakteryjnej wśród szczepów klinicznych, ze względu na zdolność *S. aureus* do pozostania w komórkach euakriotycznych *in vitro* nawet do 120 godzin (5 dni) po inwazji (70).

Niewiele wiadomo na temat mechanizmu translokacji bakteryjnej, a szczególnie u *Staphylococcus aureus*. Można znaleźć pojedyncze doniesienia o przeprowadzonych badaniach *in vitro* i *in vivo* głównie w celu porównawczym, określając największą i najmniejszą efektywność translokacji poszczególnych gatunków bakterii.

Na podstawie tych badań można stwierdzić, że jeśli dochodzi do translokacji gronkowcowej to odbywa się ona z niewielką efektywnością. Sprawdzone efektywność translokacji *S. epidermidis* do MLN u gnotobiotycznych myszy oraz *S. aureus* przez komórki Caco-2 (przy zastosowaniu płytek wielodołkowych, dwukomorowych) (15, 34).

W pierwszym badaniu (opisanym również we wstępie) największą predyspozycją do translokacji charakteryzuje się *Pseudomonas aeruginosa* oraz względne beztlenowce z rodziny Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* i *Proteus mirabilis*) następnie średnią efektywnością charakteryzowały się bakterie Gram (+), preferujące warunki tlenowe takie jak *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus brevis*. Bezwzględne beztlenowce takie jak: *Bacteroides fragilis*,

Bacteroides vulgatus i *Fusobacterium russii* są najmniej efektywne w translokacji bakteryjnej (15).

W drugim doświadczeniu otrzymano podobne wyniki. Efektywność translokacji poszczególnych gatunków wystąpiła w następującej kolejności: *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Bacteroides fragilis* (34).

Z powyższych badań wynika, że gronkowce mają mniejsze predyspozycje do translokacji od pałeczek względnie beztlenowych z rodziny Enterobacteriaceae takich jak: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis* oraz wykazują większą efektywność translokacji od bakterii bezwzględnie beztlenowych *Bacteroides fragilis* i *Fusobacterium russii*.

Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań dotyczących translokacji bakteryjnej

W związku z tym moją pracę można zaliczyć do jednych z pionierskich w tym względzie i mam nadzieję, że nastąpi kontynuacja tematu w przyszłości.

6. WNIOSKI

1. Różnice genotypowe szczepów wyizolowanych z krwi i rany potwierdziły wcześniej wykazane różnice fenotypowe.
2. Stwierdzono występowanie szczepów niespokrewnionych z krwi i rany u jednego pacjenta, a także wykazano podobieństwo genotypowe szczepów pochodzących z krwi i jelit.
3. Internalizacja *Staphylococcus aureus* typu dzikiego WT (25923) i mutantu MT (10832) przez komórki epitelialne: Caco-2 indukuje szybką akumulację transkryptów cytokin IL-8 i TNF- α w komórkach zależną od stężenia bakterii i czasu inkubacji.
 - Ø zaobserwowano tendencję malejącą w przyroście transkryptu cytokin IL-8 i TNF- α zarówno dla komórek w stadium CC jak i PC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.
 - Ø dla komórek w stadium PC stężenie wyższe bakterii: 10^9 , 10^8 , 10^7 CFU/ml było sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji, natomiast dla komórek w stadium CC już stężenie 10^6 było sygnałem wystarczającym do rozpoczęcia transkrypcji.
 - Ø niskie stężenie komórek bakteryjnych 10^5 - 10^1 CFU/ml jest nie wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji cytokin
 - Ø szczep gronkowca złocistego MT nie posiadający białka A wywoływał akumulację transkryptu IL-8 i TNF- α przy niższym stężeniu niż typ dziki WT
 - Ø zaobserwowano tendencję rosnącą w przyroście transkryptu cytokin IL-8 i TNF- α dla komórek w stadium CC w zależności od czasu inkubacji, najwyższy przyrost transkryptów zaobserwowano po upływie 4 godzin.
4. Adherencja szczepów gronkowca złocistego WT, MT, *Salmonella enteritidis* była wysoka i wyniosła: 10^8 - 10^{10} CFU/ml.
5. Szczep *Salmonella enteritidis* dokonał inwazji z największą efektywnością osiągając stężenie 10^5 - 10^6 CFU/ml, *Staphylococcus aureus* typ dziki i mutant – 10^3 - 10^4 CFU/ml.
6. Największe predyspozycje do inwazji na komórki Caco-2 mają szczepy kliniczne wyizolowane z odbytu (O=K), gdzie wzory restrykcyjne szczepów wyizolowanych z odbytu i krwi jednego pacjenta są identyczne i szczepy wyizolowane z krwi, które są różne pod względem genotypowym ze szczepem wyizolowanym z rany.

7. Inwazja komórek endotelialnych była dokonana przez szczepy *S. aureus* wyizolowane krwi chorych po urazie termicznym, które były niespokrewnione ze szczepami rany.
8. Preinkubacja komórek z inhibitorem kinaz tyrozynowych – genistyny uniemożliwiła inwazję gronkowców WT i MT do komórek Caco-2, natomiast genistyna nie wpłynęła na inwazję *S. enteritidis*.
9. Translokacja bakteryjna dla szczepów: *S. enteritidis* (S1400), *S. aureus* (WT) i (MT) następowała przy stężeniu 10^{10} CFU/ml oraz 10^8 CFU/ml dla MT, natomiast nie następowała przy stężeniu 10^9 CFU/ml dla WT oraz 10^8 – 10^9 CFU/ml dla S1400.
10. *S. aureus* (MT) wykazywał największe tendencje do translokacji bakteryjnej, większe nawet od szczepu *S. enteritidis* (S1400), który wymagał wyższego stężenia do procesu translokacji.
11. Nie zaobserwowano translokacji bakteryjnej u gronkowcowych szczepów klinicznych, prawdopodobnie ze względu zdolność szczepu *S. aureus* do przebywania w komórce eukariotycznej nawet do 5 dni, czego nie uwzględnił model badawczy.

7. STRESZCZENIE.

7.1 Streszczenie w języku polskim.

Zakażenia szpitalne spowodowane przez *Staphylococcus aureus* zwłaszcza szczepem metycylinoopornym są bardzo trudne w leczeniu ze względu na rosnącą oporność tych szczepów.

Pacjenci po urazie termicznym z rozległą powierzchnią oparzenia są szczególnie narażeni na różnego rodzaju infekcje, w tym na infekcje wywołane przez MRSA.

Do tej pory przyjmowano koncepcję, że do zakażenia uogólnionego dochodzi w wyniku kontaminacji rany oparzeniowej, następnie dochodzi do zakażenia rany, co w konsekwencji prowadzi do wnikania mikroorganizmów do krwioobiegu.

Wiadomo, że przewód pokarmowy może być rezerwuarem dla opornych szczepów gronkowca i być może w niektórych przypadkach do zakażenia krwi dochodzi nie z rany pacjenta, ale właśnie z przewodu pokarmowego w wyniku translokacji bakteryjnej.

Moja rozprawa doktorska służy wyjaśnieniu możliwości wystąpienia tego zjawiska na poziomie komórkowym.

Cele pracy

Analiza fenotypowa szczepów

- Ø określenie czynników etiologicznych zakażeń: ran, krwi i odbytu od pacjentów hospitalizowanych na Oddziałach Leczenia Oparzeń : z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich, Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu i Szpitala im. Rydygiera w Krakowie.
- Ø charakterystyka szczepów: przynależność gatunkowa, lekowrażliwość, oznaczanie wzorów oporności.

Analiza genotypowa szczepów

- Ø wykazanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA metodą PFGE
- Ø określenie wzorów restrykcyjnych szczepów
- Ø porównanie wzorów restrykcyjnych PFGE szczepów gronkowcowych pochodzących z rany, krwi i odbytu

Badanie mechanizmu translokacji bakteryjnej gronkowców przez barierę śluzówkowa *in vitro* przy użyciu komórek epitelialnych i endotelialnych

- Ø badanie interakcji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym (typ dziki, mutant) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych i czasu trwania inkubacji – ocena akumulacji transkryptów cytokin IL-8, TNF- α przy użyciu RT-PCR.
- Ø badanie adherencji, inwazji gronkowców – typu dzikiego (WT) i mutantu (MT), *Salmonella enteritidis* (pozytywna kontrola) oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych przy użyciu komórek epitelialnych i endotelialnych
- Ø badanie wpływu inhibitora kinaz tyrozynowych na inwazję *S. aureus* - typu dzikiego (WT) i mutantu (MT) oraz *Salmonella enteritidis*
- Ø badanie translokacji bakteryjnej gronkowców – typu dzikiego (WT) i mutantu (MT), *Salmonella enteritidis* (pozytywna kontrola) oraz wyselekcjonowanych szczepów klinicznych

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

WNIOSKI

1. Różnice genotypowe szczepów wyizolowanych z krwi i rany potwierdziły wcześniej wykazane różnice fenotypowe.
 2. Stwierdzono występowanie szczepów niespokrewnionych z krwi i rany u jednego pacjenta, a także wykazano podobieństwo genotypowe szczepów pochodzących z krwi i jelit.
 3. Internalizacja *Staphylococcus aureus* typu dzikiego WT (25923) i mutantu MT (10832) przez komórki epitelialne: Caco-2 indukuje szybką akumulację transkryptów cytokin IL-8 i TNF- α w komórkach zależną od stężenia bakterii i czasu inkubacji.
- Ø zaobserwowano tendencję malejącą w przyroście transkryptu cytokin IL-8 i TNF- α zarówno dla komórek w stadium CC jak i PC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych.
 - Ø dla komórek w stadium PC stężenie wyższe bakterii: 10^9 , 10^8 , 10^7 CFU/ml było sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji, natomiast dla komórek w stadium CC już stężenie 10^6 było sygnałem wystarczającym do rozpoczęcia transkrypcji.

- Ø niskie stężenie komórek bakteryjnych 10^5 - 10^1 CFU/ml jest nie wystarczającym sygnałem do rozpoczęcia transkrypcji cytokin
 - Ø szczep gronkowca złocistego MT nie posiadający białka A wywoływał akumulację transkryptu IL-8 i TNF- α przy niższym stężeniu niż typ dziki WT
 - Ø zaobserwowano tendencję rosnącą w przyroście transkryptu cytokin IL-8 i TNF- α dla komórek w stadium CC w zależności od czasu inkubacji, najwyższy przyrost transkryptów zaobserwowano po upływie 4 godzin.
4. Adherencja szczepów gronkowca złocistego WT, MT, *Salmonella enteritidis* była wysoka i wyniosła: 10^8 - 10^{10} CFU/ml.
 5. Szczep *Salmonella enteritidis* dokonał inwazji z największą efektywnością osiągając stężenie 10^5 - 10^6 CFU/ml, *Staphylococcus aureus* typ dziki i mutant – 10^3 - 10^4 CFU/ml.
 6. Największe predyspozycje do inwazji na komórki Caco-2 mają szczepy kliniczne wyizolowane z odbytu (O=K), gdzie wzory restrykcyjne szczepów wyizolowanych z odbytu i krwi jednego pacjenta są identyczne i szczepy wyizolowane z krwi, które są różne pod względem genotypowym ze szczepem wyizolowanym z rany.
 7. Inwazja komórek endotelialnych była dokonana przez szczepy *S. aureus* wyizolowane krwi chorych po urazie termicznym, które były niespokrewnione ze szczepami rany.
 8. Preinkubacja komórek z inhibitorem kinaz tyrozynowych – genistyny uniemożliwiła inwazję gronkowców WT i MT do komórek Caco-2, natomiast genistyna nie wpłynęła na inwazję *S. enteritidis*.
 9. Translokacja bakteryjna dla szczepów: *S. enteritidis* (S1400), *S. aureus* (WT) i (MT) następowała przy stężeniu 10^{10} CFU/ml oraz 10^8 CFU/ml dla MT, natomiast nie następowała przy stężeniu 10^9 CFU/ml dla WT oraz 10^8 – 10^9 CFU/ml dla S1400.
 10. *S. aureus* (MT) wykazywał największe tendencje do translokacji bakteryjnej, większe nawet od szczepu *S. enteritidis* (S1400), który wymagał wyższego stężenia do procesu translokacji.
 11. Nie zaobserwowano translokacji bakteryjnej u gronkowcowych szczepów klinicznych, prawdopodobnie ze względu na zdolność szczepu *S. aureus* do przebywania w komórce eukariotycznej nawet do 5 dni, czego nie uwzględnił model badawczy.

7.2 Streszczenie w języku angielskim.

“The research of possibility bacterial translocation of *Staphylococcus aureus* in burn-injury patients”

Nosocomial infections are a very serious problem in contemporary medicine. This kind of infection manifests in patients during hospital confinement or following hospital discharge. Patients display characteristic clinical symptoms, which are confirmed by microbiological tests.

Nosocomial infections are categorised as exogenous and endogenous.

Exogenous infections originate from other patients or from the hospital environment. Endogenous infections establish as a result of disturbance of bacterial microflora in the intestine.

The mucus membrane of intestine in healthy individuals should protect from the pathogens and their endotoxins. When this function is disrupted, the indigenous bacteria or their endotoxins pass from the gastrointestinal tract to the extraintestinal sites, including the mesenteric lymph-node complex, liver, spleen and bloodstream. This process is referred to as bacterial translocation and can induce sepsis.

Three major mechanisms promote bacterial translocation; intestinal bacterial overgrowth, deficiencies in host immune defenses and increased permeability following damage to the intestinal mucosal barrier caused by immunosuppression, thermal injury, chemotherapy, antibiotic therapy, malnutrition, bowel obstruction and starvation. Thermal injury impairs host immune defenses and damages the physical barrier properties of the intestinal mucosa.

The Gram-positive microorganism *Staphylococcus aureus* is a common cause of nosocomial infections and this microbe is increasingly difficult to eradicate. Previously it had been suggested that different phenotypes of *Staphylococcus* can co-exist in microenvironments, which under appropriate conditions, can induce local or general systemic, contagious infections.

Valid theories proposed thus far are that sepsis (penetration microbes to blood circulation) arises in burn-injury patients as a result of contamination of the scald or wound following conquest of defensive barriers. The observation that bacterial strains isolated from the scald are phenotypically and genotypically distinct from the strains in the blood of infected patients presents an additional possibility

or hypothesis; namely that some invasive strains of *Staphylococcus aureus* can pass from the intestinal lumen to the extraintestinal sites.

Little is known about the mechanisms involved in bacterial translocation from the intestinal lumen to extraintestinal sites although it is known that *Staphylococcus aureus* can colonize the intestinal tract thereby presenting a potential reservoir for antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*.

The experiments described in my thesis were designed to investigate the nature of the interactions between clinically-isolated *Staphylococcus aureus* strains and cultured intestinal epithelial and blood vessel endothelial cells with a view to clarifying the relative contribution of intestinal translocation of *Staphylococcus aureus* to nosocomial systemic infections and bacterial sepsis

Objectives of work:

- Ø Identification origin of sepsis
- Ø Establish a relationship between bacterial translocation of *Staphylococcus aureus* across epithelial and endothelial monolayers and bacterial sepsis
- Ø Investigation of the mechanisms of bacterial translocation of *Staphylococcus aureus* using *in vitro* cell lines.

Initially samples were obtained from burn-injury patients; samples were derived from scald, blood and intestine.

Further work was focused on three parts.

1. Analyses of phenotype of *S. aureus* strains, including their morphological and biochemical profile. Bacteria were cultured on appropriate, selective media, microscopically evaluated and assessed for enzymatic activity and susceptibility to antibiotics.
2. Genotype was determined using chromosomal DNA derived from bacterial strains and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). This method permitted the assessment of the genetic similarity of strains.

It was considered important to identify strains either common to the blood and intestine or completely different strains from the blood and scald, as these would provide the basis for selection of clinical isolates for investigation of their ability to translocate across cell monolayers *in vitro*.

3. In the third part the mechanism of bacterial translocation was investigated using both culture collection strains and the selected clinical isolates - In the case of the culture collection both a wild type and mutant (without protein A) *S. aureus* was selected. As a positive control for bacterial translocation and invasion across epithelial cells, *Salmonella enteritidis*, an invasive intestinal pathogen, provided a positive control.

The work undertaken in part 3 involved assessing the attachment, internalization, translocation *Staphylococcus aureus* and its interaction with cytoskeletal elements including its ability to induce signal transduction pathways.

The impact of such interactions on cytokines gene expression, and importantly, the ability of *Staphylococcus aureus* to translocate across intestinal epithelial cells was determined.

Techniques including intestinal cell culture, transwell cell culture, confocal microscopy and fluorescence detection were utilised. To research cytokine gene expression RNA was isolated from cultured cells following incubation with culture collection and clinical strains of *S. aureus* followed by reverse transcription and semi-quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR).

General conclusions:

- Ø Both the mutant and wild-type culture collection strains of *S. aureus* attached, internalized and translocated across intestinal epithelial cells.
- Ø Specific strains of clinical isolates of *S. aureus* internalized efficiently within intestinal epithelial and endothelial cells,
- Ø Specific strains of clinical isolates of *S. aureus* were found not to translocate except for one strain.
- Ø Internalization of *Staphylococcus aureus* induces cytokine gene expression, it depend on time incubation and concentration of bacteria.
- Ø Inhibition of tyrosine kinase signalling using genistein prevented *S. aureus* invasion.

8. LITERATURA

1. Abele-Horn, Schupfner B., Emmerling P., Waldner P., Göring H., Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection*. 2000, 28: 53.
2. Agerer F., Michel A., Ohlsen K., Hauck C.R., Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src Family Protein-tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278 (43): 42524-42531.
3. Alexander J.W., New data on enteral feeding, selected nutrients, microbial translocation and postsurgical sepsis. *The Journal of Critical Care Nutrition*. 1994, 2, 2: 14-19.
4. Allaoui A., Mounier J., Prevost C., Sansonetti P.J., Parsot C., *iscB*: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusion during intercellular spread. *Mol. Microbiol.* 1992, 6: 1605-1616.
5. Almeida R.A., et al., *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy. Sci.* 1996, 79:1021-1026.
6. Ambrose N.S., Johnson M., Burdon D.W. Keighley M.R.B., Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br. J. Surg.* 1984, 71: 623-625.
7. Amin I.I., Dounce G.R., Osborne M.P., Stephen J., Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by *Salmonella typhimurium* strains which differ in virulence in a model of gastroenteritis. *Infect. Immun.* 1994, 62: 569-578.
8. Bardadin K., Podstawy zjawisk immunologicznych. W J. Jastrzębski Wstrząs septyczny. *Niewydolność wielonarządowa (pod red.) J. Jastrzębski. α-medica press.* 1996, 4: 59-104.
9. Bauer A., Kirby W.M, M., Sherris J.C., Turck., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American J. of Clinical Pathol.* 1966, 45: 493-496.
10. Baumgartner T.G., Cerda J.J., Enteral nutrition. *Current Opinion in Gastroenterology.* 1993, 9: 284-291.
11. Bayles K.W., Wesson C.A., Liou L.E., Fox L.K., Bohach G.A., Trumble W.R., Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 1998, 66: 336-342.
12. Becker W.K., Cioffi W.G., McManus A.T., Kim S.H., Mason A.D., Priutt B.A., Fungal wound infection. A 10-year experience. *Arch. Surg.* 1991, 126 (1): 44-48.
13. Bengmark S., Ecnutrition and health maintenance – A new concept to prevent GI inflammation, ulceration and sepsis. *Clin. Nutr.* 1996, 15: 1-10.
14. Berg R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. *Current Microbiology* . 1983, 8: 285-292.

15. Berg R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology*. 1995, 3 (4): 149-154.
16. Berg R.D., Bacterial translocation from the intestinal tract. *J. Med.* 1992, 23: 217-244.
17. Berg R.D., Bacterial translocation from the intestines. *Experimental animals*. 1985, 34: 1-16.
18. Berg R.D., Factors influencing the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract. *Recent Advances in Germfree Research*, Tokaii University Press, Tokyo. 1981, 411-418.
19. Berg R.D., Garlington A.W., Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesentric lymph nodes and other organs in an gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.* 1979, 23: 403- 411.
20. Berg R.D., Inhibition of *E. coli* translocation from the gastrointestinal tract by normal cecal flora in gnotobiotic or antibiotic-decontaminated mice. *Infect. Immun.* 1980, 29: 1073-1081.
21. Berg R.D., Owens W.E., Inhibition of viable *E. coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. *Infect. Immun.* 1979, 25: 820-827.
22. Berg R.D., Translocation and the indigenous gut flora. *Probiotics. The Scientific Basis*. Chapman & Hall. London. 1992, 55-85.
23. Berg R.D., Translocation of enteric bacteria in health and disease, in *Gut-Derived Infectious-Toxic Shock (GITS). A major variant of septic shock* (eds H. Cottier and R. Kraft). *Current Studies in Hematology and Blood Transfusion* 59, S. Karger, Basel. 1992, 44-65.
24. Berg R.D., Translocation of the indigenous bacteria from the intestinal tract. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, Academic Press, New York. 1983, 333-352.
25. Berg R.D., Translocation of microbes from the intestinal tract w Medical importance of the normal microflora Tannock G.W (red.). *Kluwer Academic Publishers*. 1999: 338-370.
26. Berg R.D., Wommack E., Deitch E.A., Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. 1988, 123: 1359-1364.
27. Billiar T.R., Maddus M.A., West M.A. i in., Intestinal gram-negative bacterial overgrowth in vivo arguments the in vitro response of Kupffer cells to endotoxin. *Ann. Surg.* 1988, 208: 532.
28. Brathwaite C.E., Ross S.E., Nagele R. i in., Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence. *Journal of Trauma*. 1993, 34: 586-590.

29. Buggy B.P., Schaberg D.R., Swartz R.D., Intraleukocyte sequestration as a cause of persistent *Staphylococcus aureus* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Med.* 1984, 76: 1035.
30. Bulanda M., Nadzór nad zakażeniami o etiologii gronkowcowej u chorych po urazie termicznym, rozprawa habilitacyjna., 1999; Kraków.
31. Canil C., Rosenshine I., Ruschkowski S., Donnenberg M.S., Kaper J.B., Finlay B.B., Enteropathogenic *E. coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect. Immun.*, 1993, 61: 2755-2762.
32. Carrico C. J., Meakins J.L., Marshall J.C. i in., Multiple organ failure syndrome. *Archives of Surgery.* 1986, 121: 196-208.
33. Chien J.W., Optymalne wykorzystanie posiewów krwi. *Medycyna po dyplomie.* 1999, 8 (2): 24-32.
34. Cruz N., Qi L., Alvarez X et al., The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *Journal of Burn Rehabilitation.* 1994, 15: 207-212.
35. Dabiri G.A., Sanger J.M., Portnoy D.A., Southwick F.S., *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87: 6068-6070.
36. Deitch E.A., Winterton J., Berg., Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation. *Arch. Surg.* 1987, 122: 1019.
37. Deitch E.A., Bacterial translocation of the gut flora. *The Journal of Trauma.* 1990, 30 (12): 184-189.
38. Deitch E.A., Berg R.D., Specian R., Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. *J. Trauma.* 1987, 27: 161-166.
39. Deitch E.A., Multiple Organ Failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.* 1992, 216: 117-134.
40. Deitch E.A., Role of bacterial translocation in necrotising enterocolitis. *Acta Paediatr. Suppl.* 1994, 396: 33-6.
41. Deitch E.A., Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch. of Surg.* 1989, 124: 699-701.
42. Deitch E.A., The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch. Surg.* 1990, 125: 403-404.
43. Deitch E.A., Winterton J., Li M., Berg R.D., The gut as a portal of entry for bacteriemia. Role of protein malnutrition. *Ann. Surg.* 1987, 205: 681-692.

44. Dzierżanowska D., Jeljaszewicz J. (pod red.), Zakażenia szpitalne. α -medica press. Bielsko- Biała. 1999, 2.1: 68-71.
45. Dzierżanowska K., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W., Trumble W.R., Bohach G.A., Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999, 67: 4673-4678.
46. Feller I., Jones C.A., Horosons in burn care. *Advances in burn care. Clin. Plast. Surg., Sandere Comp. Philadelphia.* 1986, 13: 151-160.
47. Finegold S.M., Mathisen G .E., George W.L., Changes in human intestinal flora related to the administration of antimicrobial agents. W Hentges D.J (ed.), *Human Intestinal Microflora in Health and Disease.* Acedemic Press. New York, 1983, 355-446.
48. Finegold S.M., Mathisen G.E., George W.L., Normal indigenous intestinal flora. W Hentges D.J. (ed.), *Human Intestinal Microflora in Health and Disease.* New York: Academic Press. 1983, 3-31.
49. Finlay B.B., Cossart P., Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 1997, 276:718-725.
50. Finlay B.B., Gumbiner B., Falkow S., Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J. Cell. Biol.* 1988, 107: 221-230.
51. Foster T.J., Hook M., Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus* . *Trends Microbiol.* 1998, 6: 484-488.
52. Fuller R., Jayne-Williams D. J., Resistance of the fowl (*Gallus domesticus*) to invasion by its intestinal flora. II. Clearance of translocated intestinal bacteria. *Res. Vet. Sci.* 1970, 11: 368-374.
53. Gahring L.C., Heffron F., Finlay B.B., Falkow S., Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.*1990, 58: 443-448.
54. Gaillard J.L., Berche J., Mounier J., Richard S., Sansonetti P., In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 1987, 55: 2822-2829.
55. Gautreaux M., Deitch E., Berg R.D., T-cells in the host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity.* 1994, 62: 2874-2884.
56. Gautreaux M.D., Deitch E.A., Berg R.D., Immunological mechanisms preventing bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Microecology and Therapy.* 1990, 20: 31-34.
57. Glik J., Kawecki M., Ziółkowski G., Tomanek E., Zakażenia krwi i ich czynniki etiologiczne u chorych oporzonych. Nie opublikowano. 2004.

58. Goering, R.V, Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp. Epidemiol.*, 1993; 14: 595-600.
59. Goldberg M.B., Sansonetti P.J., Shigella subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect. Immun.* 1993, 61: 4941-4946.
60. Gorbach S.L., Plaut A.G., Nahas L., Spanknebel G., Levitan R., Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology*. 1967, 53: 856.
61. Gospodarek E., Właściwości adhezyjne drobnoustrojów a zakażenia szpitalne. *Zakażenia*. 2001.
62. Gospodarek E., Zakażenia krwi – strategie diagnostyczne. *Magazyn medyczny*. 2002, 8: 24-32.
63. Gravet A., Hart-Monteil J., Scheftel H., Predominant *Staphylococcus aureus* in stools is responsible for postantibiotic diarrhea and produces lukE/lukD and enterotoxin A. Abstracts of 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin. 1999, abstract P697
64. Gresham H.T., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L., Lindberg F.P., Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* 164: 3713-3722.
65. Grzybowski J., Cytokiny. W Grzybowski J. *Biologia rany oparzeniowej* α-medica press. 2001, 38-42.
66. Guzik K., Ocena produkcji cytokin. W Pryjma J. (pod red.) *Ćwiczenia z immunologii*, Instytut Biologii Molekularnej UJ. Kraków. 1999, IV C: 39-43.
67. Guzik K., RT-PCR reakcja łańcuchowa polimerazy w badaniach ekspresji genów. W Bugno M., Rokita H. (pod red.) *Podstawowe techniki biologii molekularnej i biotechnologii*, Instytut Biologii Molekularnej UJ. Kraków. 1999, 14: 55-61.
68. Hamil R.J., Vann J.M., Proctor R.A., Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect. Immun.* 1986, 54: 833-836.
69. Harmsen A.G., Muggenburg B.A., Snipes M.B., Bice D.E., The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science*. 1985, 230: 1277-1280.
70. Hess D.J., Henry-Stanley M.J., Erickson B.A., Wells C.L., Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *Journal of Surgical Research*. 2003, 114: 42-49.
71. Higerd T.B., Fowler S. (tł. M. Wątroba), Ziarenkowce Gram-dodatnie: *Staphylococcus* i *Streptococcus*. W Virella G., wyd pol. pod red. Heczko P.B., *Mikrobiologia i choroby zakaźne.*, Wyd. Med. Urban & Partner, Wrocław, 2000, 113-118.

-
72. Hudson M.C., Ramp W.K, Nicholson A.S., Williams A.S., Nousiainen M.T., Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 1995, 19: 409-419.
73. Jabłoński L., Podstawy mikrobiologii lekarskiej. PZWL. Warszawa. 1986.
74. Jastrzębski J., Wstrząs septyczny. Niewydolność wielonarządowa. α -medica press. Bielsko- Biała. 1996, 11: 174-177.
75. Jett B.D., Gilmore M.S., Internalization of *Staphylococcus aureus* by human corneal epithelial cells: role of bacterial fibronectin-binding protein and host cell factors. *Infection and Immunity.* 2002, 70 (8): 4697-4700.
76. Jevon M., Guo C., Ma B., Mordan N., Nair S.P., Harris M., et al., Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infection and Immunity.* 1999, 67 (5): 2677-2681.
77. Jones W.G., Minei J.P., Barber A.E., Rayburn J.L., Fahey T.J., Shires T., Bacterial translocation and intestinal atrophy after thermal injury and burn wound sepsis.. *Ann. Surg.* 1990, 211 (4): 399-405.
78. Jung K.J., Cha J.D., Lee S.H., Woo W.H., Lim D.S., Choi B.K., Kim K.J., Involvement of staphylococcal protein A and cytoskeletal actin in *Staphylococcus aureus* invasion of cultured human oral epithelial cells . *J. Med. Microbiol.* 2001, 50: 35-41.
79. Kahl B.C., Goulian M., van Wamel W., Herrmann M., Simon S.M., Kaplan G., Peters G., Cheung A.L., *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in pulmonary epithelial cell line. *Infect. Immun.* 2000, 68 (9): 5385-5392.
80. Kapral F., Shayegani F., Intracellular survival of staphylococci. *J. Exp. Med.* 1959, 110: 123.
81. Keren D.F., Antigen processing in the mucosal immune system. *Seminars in Immunology.* 1992, 4: 217-226.
82. Kędzia W.(pod red.), Mikrobiologia dla farmaceutów. AM w Poznaniu. 1994, 10:249-254.
83. Kirsop B.E., Snell J.J., Maintenance of Microorganisms.w: A Manual of Laboratory Methods.Academic Press., 1984.
84. Koziol J.M., Rush B.F. Jr, Smith S.M. i in., Occurrence of bacteriemia during and after hemorrhagic shock. *J. Trauma.* 1988, 28: 10.
85. Krasemann Ch., Pobieranie i transportowanie materiałów do badań mikrobiologicznych. Polskie Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych. Kraków., 1995.
86. Kurnatowski W., Zapobieganie zakażeniom w oparzeniach. *Magazyn medyczny.* 2002, 7-13.

87. Litwin J.A., Hodowla komórek i tkanek. W Litwin J.A Podstawy technik mikroskopowych. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego. 1999, 10:126-133.
88. Lowbury E. J. L. Control of Hospital Infection, 2-gie wyd. Chapman and Hall, London 1981.
89. Lowbury E., Ayliffe G., Geddes A., Wiliams J. Zakażenia szpitalne. PZWL. Warszawa. 1981.
90. Lowy F.D., et al., Staphylococcus aureus – human endothelial cells interactions. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 1988, 98: 137-146.
91. Lowy F.D., *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med., 1998, 339: 520-532.
92. Lyon B., Skurray R., Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. Microbiol. Rev. 1987, 51: 88-134.
93. Ma L., Specian R.D., Berg R.D., Deitch E.A., Effects of protein malnutrition and endotoxin on the intestinal mucosal barrier to the translocation of indigenous flora in mice. 1989, 13: 572-578.
94. Mach-Wójkowska J., Bulanda M., Adamski P., Heczko P, Wstępna analiza danych uzyskanych w ramach programu kontroli zakażeń. Terapia. 1993, 3/1: 3-6.
95. Maejima K., Deitch E.A., Berg R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of rats receiving thermal injury. Infect. Immun. 1984, 43: 6-10.
96. Maejima K., Deitch E.A., Berg R.D., Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. Arch. Surg. 1984, 119: 166-172.
97. Marano M.A., Moldawer L.L., Fong Y., et al. Cachectin/TNF production in experimental burns and Pseudomonas infection. Arch. Surg. 1988, 123: 1383-1388.
98. Maslow, N. J., Slutsky, A., Arbeit R.D., Applications-Molecular Typing Methods, rozdz. 7.1, 1993; 563-572.
99. McManus W.F., Goodwin C.W., Mason A.D., Pruitt B.A., Burn wound infection. J. Trauma. 1981, 21: 753-756.
100. Melly M.J., Thomison J., Rogers D., Fate of staphylococci within human leukocytes. J. Exp. Med. 1960, 112: 1121.
101. Menzies B.E., Kourteva I., Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. Infect. Immun. 1998, 66: 5994-5998.
102. Mikelsaar M., Sepp E., Julge K., Vasar M., Ducher B., The microflora of the intestinal tract as a reservoir for microbial translocation – is it similar in young children of Sweden and Estonia? Abstracts of 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin. 1999, abstract P701.

103. Miller V.L., Finlay B.B., Falkow S., Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*. *Top. Microbiol. Immunol.* 1988, 138: 15-39.
104. Moore F.A., Moore E.E., Poggetti R. i in., Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *Journal of Trauma.* 1991, 31: 629-638.
105. Moore F.A., Moore E.E., Poggetti R., Read R.A., Postinjury shock and early bacteremia. *Archives of Surgery.* 1992, 127: 893-898.
106. Morehouse J., Specian R., Stewart J., Berg R.D., Promotion of the translocation of indigenous bacteria of mice from the gastrointestinal tract by oral ricinoleic acid. *Gastroenterology.* 1986, 91: 673-682.
107. Morris S.E., Navaratnam N., Townsend C. M. i in., Decreased mesenteric blood flow independently promotes bacterial translocation in chronically instrumented sheep. *Surg. Forum* 1989, 40: 88.
108. Mounier J., Vasselon T., Hellio R., Lesourd M., Sansonetti P.J., *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect. Immun.* 1992, 58: 1048 –1058.
109. Murray P.R., *Manual of Clinical Microbiology /sixth edition/*, ASM Press Washington D.C., 1995.
110. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests – fifth edition; approved standard. NCLSS document M2-A5, Villanova PA, 1993.
111. Ogawa S.K., et al. Bacterial adherence in endocarditis: adherence to human endothelial cells. *Infect. Immun.* 1985, 50: 218-224.
112. Owens W.E., Berg R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of thymectomized mice. *Current Microbiology.* 1982, 7: 169-174.
113. Owens W.E., Berg R.D., Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. *Infect. Immun.* 1980, 27: 461-467.
114. Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Hook M., MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, 48: 585-617.
115. Penn R.L., Maca R.D., Berg R.D., Leukemia promotes the translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs. *Microecology Therapy.* 1985, 15: 85-91.
116. Perdomo J.J., Gounon P., Sansonetti P.J., Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.* 1994, 93: 633-643.

117. Philips T.E., Huet C., Bilbo P.R., Podolsky D.K., Louvard D., Neutra M.R., Human intestinal goblet cells in monolayer culture: characterization of a mucus-secreting subclone derived from the HT29 colon adenocarcinoma cell line. *Gastroenterology*. 1988, 94: 1390-1403.
118. Portnoy D.A., Chakraborty T., Goebel W., Cossart P., Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 1992, 1263-1267.
119. Pranatharthi H., Brown W., Clinical issues of blood cultures. *Arch. Intern. Med.* 1994, 154 (25): 841-849.
120. Przondo-Mordarska A., (pod red.), Zakażenia szpitalne. Etiologia i przebieg. Wyd. Continuo. Wrocław. 1997. 1.5: 15-20.
121. Przondo-Mordarska A., Stankiewicz M., Zakażenia krwi, posocznica. *Nowa medycyna*. 1997, 4: 35-41.
122. Pucciarelli M.G., Finlay B.B., Polarized epithelial monolayers: model system to study bacterial interactions with host epithelial cells. *Meth. Enzymol.* 1994, 236: 438-447.
123. Quie P.G., Perturbation of the normal mechanisms of intraleucocytic killing of bacteria. *J. Infect. Dis.* 1983, 148: 189-193.
124. Reed L.L., Martin M., Mangano R. et al., Bacterial translocation following abdominal trauma in humans. *Circulatory Shock*. 1994, 42: 1-6.
125. Reiss J., Grzybowski J., Definicje zakażeń szpitalnych. *Zakażenia*. 1997, 1: 20-32.
126. Richards M.J., Edwards J.R., Culver D.H., Gaynes R.P., National Nosocomial Infections Surveillance System. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit. Care Med.*, 1999, 27: 887.
127. Rimland D., Roberson B., Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 24: 137.
128. Rogers D., Tompsett R., The survival of staphylococci within human leukocytes. *J. Exp. Med.* 1952, 95: 209.
129. Ross A., mRNA stability in mammalian cells. *Microbiological Reviews*. 1995, 59: 423.
130. Rush B.F. Jr, Sori A.J., Murphy M.S. i in., Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock: the link between trauma and sepsis? *Ann. Surg.* 1988, 207: 549-554.
131. Samet A., Śledzińska A., Bronk M., Komarnicka J., Dzierżanowicz E., Wyszczelski M., Występowanie metycyloopornych szczepów *S. aureus* (MRSA) w posiewach pacjentów PSK w Gdańsku w latach 1996-1998. *Klin. Chorób Zakaż. i Zakaż. Szpit.*, 1999, 3, 1: 29-33.

132. Sansonetti P.J., Molecular mechanism of cell and tissue invasion by *Shigella flexneri*. *Inf. Agents. Dis.* 1993, 2: 201-206.
133. Schweinburg F.B., Seligman A.M., Fine J., Transmural migration of intestinal bacteria. A study based on the use of radioactive *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 1950, 242: 747.
134. Sedman P.C., Macfie J., Sagar P. i in., The prevalence of the gut translocation in humans. 1994, 107, 643-649.
135. Sinha B., Francois P., Vaudaux P., Foti M., Hartford O.M., Foster T.J., Lew D.P., Hermann M., Krause H., Fibronectin binding protein acts as *S aureus* invasion via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell. Microbiol.* 1999, 1: 101-118.
136. Sori A.J., Rush B.F. Jr, Lysz T.W. i in., The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *Am J. Surg.* 1988, 155: 187.
137. StaszkieWicz W. i współ., Praktyczne zasady kontroli zakażeń szpitalnych. Zbiór rekomendacji i procedur dla polskich szpitali. Warszawa. 2000, 17.
138. Steffen E.K., Berg R.D., Deitch E.A., Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J. of Infect. Dis.* 1988, 157: 1032-1037.
139. Tancrede C.H., AndreMont A.O., Bacterial translocation and gramnegative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J. Infect. Dis.* 1985, 152: 99-103.
140. 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 (9): 2233-2239.
141. van der Waaij D., Berghuis-de J.M., Lekkerkerk-van der Wees J.E. C., Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg. (Camb).* 1971, 69: 405-411.
142. van der Waaij D., Berhuis- deVries J.M., Lekkerkerk-van der Wees J. E. C., Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. *J. Hyg. (Lond).* 1973, 70: 335-342.
143. Vincent P., Colombel J.F., Lescut D. I in., Bacterial translocation in patients with colorectal cancer. *J. Infect. Dis.* 1988, 158: 1395-1396.
144. Virella G., tł. Heczko P.B. (pod red.), *Mikrobiologia Lekarska*, Urban & Partner, Wrocław, 2000.
145. Wells C.L., Maddaus M.A., Simmons R.L., Role of macrophages in the translocation of intestinal bacteria. *Arch. Surg.* 1987, 122: 48-53.

-
146. Wells C. L., Maddaus M. A., Simmons R.L., Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 1988, 10:958.
 147. Wells C.L., Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplantation Preceeding.* 1996, 28, 5: 2653-2656.
 148. Wolf J.L., Bye W.A., The membronus epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Ann. Rev. Med.* 1984, 35: 95-112.
 149. Wolochow G., Hilderbrand G. J., Lamanna C., Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J. Infect. Dis.* 1966, 116: 523-528.
 150. Yao L., Bengualid V., Lowy F.D., Gibbons J.J., Hatcher V.B., Berman J.W., Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 1995 , 63 (5): 1835-1839.
 151. Zaremba M. L., Borowski J. *Mikrobiologia lekarska, podręcznik dla studentów medycyny.* PZWL. Warszawa. 1997, 267-276.
 152. Zychlinsky A., Prevost M.C., Sansonetti P.J., *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature.* 1992, 358: 167-169.

Wykaz tabel

Tab. 1	Zewnątrzkomórkowe i komórkowe czynniki chorobotwórczości <i>S. aureus</i>	10
Tab. 2	Czynniki etiologiczne zakażeń krwi występujących u chorych oparzonych hospitalizowanych w 2002 roku.....	14
Tab. 3	Czynniki etiologiczne zakażeń krwi u chorych oparzonych, którzy zmarli w 2002 roku.....	15
Tab. 4	Czynniki etiologiczne zakażeń krwi u chorych oparzonych, którzy zostali wyleczeni w 2002r. (49 chorych).....	15
Tab. 5	Czynniki inicjujące proces translokacji bakteryjnej – model zwierzęcy.....	17
Tab. 6	Etapy patogenezy translokacji bakteryjnej z przewodu pokarmowego.....	21
Tab. 7	Translokacja bakterii kolonizujących przewód pokarmowy człowieka do MLN, bakterie najczęściej identyfikowane w MLN to: <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacteroides</i>	22
Tab. 8	Mechanizmy gospodarza broniące przed translokacją	23
Tab. 9	Izolacja i identyfikacja gronkowca.....	35
Tab. 10	Diagnostyka różnicowa gatunków gronkowców	44
Tab. 11	Pochodzenie wyizolowanych szczepów gronkowca ze względu na materiał diagnostyczny i ośrodek badawczy.....	76
Tab. 12	Podział zidentyfikowanych gronkowców pochodzących z Oddziałów Leczenia Oparzeń.....	77
Tab. 13	Analiza porównawcza szczepów wyizolowanych z krwi, rany i odbytu.....	78
Tab. 14	Tabela odczytu API STAPH.....	82
Tab. 15	Wielkości średnic zahamowania wzrostu szczepów gronkowcowych w metodzie dyfuzyjno-krażkowej na oznaczanie oporności na metycylinę.....	84
Tab. 16	Szczegółowa charakterystyka szczepów z rodzaju <i>Staphylococcus</i> izolowanych z Oddziału Leczenia Oparzeń: Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich (CLOS), Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P) i szpitala im. Rydygiera w Krakowie (Rd).....	86
Tab. 17	Szczegółowa charakterystyka czynników etiologicznych izolowanych od pacjentów z Oddziału Leczenia Oparzeń Polsko-amerykańskiego Instytutu Pediatrii w Krakowie-Prokocimiu (P).....	89
Tab. 18	Antybiotykooporność szczepów gronkowcowych wrażliwych i opornych na metycylinę z CLOS.....	90
Tab. 19	Wzory oporności szczepów MRSA na antybiotyki.....	97
Tab. 20	Antybiogramy szczepów wyizolowanych z rany i krwi (R-K).....	98

Tab. 21 Wzory restrykcyjne PFGE badanych szczepów.....	100
Tab. 22 Wzory oporności głównych typów genetycznych.....	103
Tab. 23 Podział szczepów gronkowcowych wyizolowanych z krwi, rany, odbytu od jednego pacjenta o różnym i tym samym profilu genetycznym.....	104
Tab. 24 Stężenie RNA (μg/ml) (14-20).....	118
Tab. 25 Względna intensywność GAPDH (14-20).....	119
Tab. 26 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (14-20).....	120
Tab. 27 Względna intensywność TNFα. Współczynnik ilościowy TNF-α/GAPDH (14-20).....	122
Tab. 28 Przyrost transkryptu IL-8 i TNFα w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (14-20).....	122
Tab. 29 Stężenie RNA (μg/ml) (79-98).....	124
Tab. 30 Względna intensywność GAPDH (79-98).....	125
Tab. 31 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (79-98).....	126
Tab. 32 Względna intensywność TNFα. Współczynnik ilościowy TNF-α/GAPDH (79-98).....	129
Tab. 33 Przyrost transkryptu IL-8 i TNFα w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).....	132
Tab. 34 Stężenie RNA (μg/ml) (99-118).....	133
Tab. 35 Względna intensywność GAPDH (99-118).....	134
Tab. 36 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (99-118).....	135
Tab. 37 Względna intensywność TNFα. Współczynnik ilościowy TNF-α/GAPDH (99-118).....	137
Tab. 38 Przyrost transkryptu IL-8 i TNFα w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).....	139
Tab. 39 Stężenie RNA (μg/ml) (119-138).....	142
Tab. 40 Względna intensywność GAPDH (119-138).....	143
Tab. 41 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (119-138).....	144
Tab. 42 Względna intensywność TNF-α. Współczynnik ilościowy TNF-α/GAPDH (119-138).....	146

Tab. 43 Akumulacja cytokin: IL-8, TNF α w zależności stężenia komórek bakteryjnych WT i MT (119-138).....	148
Tab. 44 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (139-158).....	149
Tab. 45 Względna intensywność GAPDH (139-158).....	150
Tab. 46 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (139-158).....	151
Tab. 47 Względna intensywność TNF- α . Współczynnik ilościowy TNF- α /GAPDH. (139-158).....	153
Tab. 48 Akumulacja cytokin: IL-8, TNF α w zależności stężenia komórek bakteryjnych WT i MT (139-158).....	155
Tab. 49 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (1-6).....	160
Tab. 50 Względna intensywność GAPDH (1-6).....	161
Tab. 51 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy (1-6).....	162
Tab. 52 Stężenie RNA ($\mu\text{g/ml}$) (39-47).....	165
Tab. 53 Względna intensywność GAPDH (39-47).....	166
Tab. 54 Względna intensywność IL-8. Współczynnik ilościowy IL-8/GAPDH (39-47).....	167
Tab. 55 Względna intensywność. Współczynnik ilościowy TNF- α (39-47).....	170
Tab. 56 Analiza genotypowa szczepów klinicznych pochodzących z rany, krwi i odbytu.....	176
Tab. 57 Szczepy kliniczne wyselekcjonowane do dalszych badań.....	176
Tab. 58 Ilość koloni gronkowców po inkubacji z gentamycyną (100 $\mu\text{g/ml}$) i lisostafiną (20 $\mu\text{g/ml}$).....	177
Tab. 59 Stężenie końcowe gronkowców (CFU/ml).....	178
Tab. 60 Wrażliwość i oporność szczepów klinicznych na gentamycynę i lisostafinę.....	178
Tab. 61 Stężenie końcowe WT, MT - ilość kolonii bakteryjnych przy rozcieńczeniu 10^{-5} (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC).....	182
Tab. 62 Ilość koloni gronkowców WT i MT przy rozcieńczeniu 10^{-5} (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC).....	182
Tab. 63 Stężenie końcowe gronkowców WT i MT (CFU/ml) (16-17 PC, 8-9 PC, 2-3 PC).....	183

Tab. 64	Ilość koloni szczepów WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu $10^{-1} - 10^{-5}$	183
Tab. 65	Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml).....	183
Tab. 66	Ilość koloni gronkowców WT i MT przy rozcieńczeniu $10^{-1} - 10^{-5}$ (6-7 PC).....	184
Tab. 67	Stężenie końcowe gronkowców WT, MT, S1400 (CFU/ml) (7-8 PC).....	184
Tab. 68	Stężenie początkowe i końcowe – ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> przy rozcieńczeniu $10^0 - 10^{-9}$ (4-5 PC, 10-11PC).....	185
Tab. 69	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (4-5 PC, 10-11PC).....	186
Tab. 70	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (4-5 PC, 10-11PC) c.d.....	187
Tab.71	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (4-5 PC, 10-11PC) c.d.....	188
Tab 72	Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne (4-5 PC, 10-11PC).....	189
Tab. 73	Stężenie początkowe i końcowe - ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> przy rozcieńczeniu $10^0 - 10^{-9}$ (3-4 PC, 17-18PC).....	190
Tab. 74	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 17-18PC).....	193
Tab.75	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 17-18PC) c.d.....	194
Tab. 76	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 17-18PC) c.d.....	195
Tab 77	Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne (3-4 PC, 17-18PC).....	196
Tab. 78	Stężenie początkowe i końcowe - ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> przy rozcieńczeniu $10^0 - 10^{-8}$ (3-4 PC, 10-11PC).....	197
Tab. 79	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 10-11PC).....	198
Tab. 80	Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 10-11PC) c.d.....	199

Tab. 81 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych (3-4 PC, 10-11PC) c.d.....	200
Tab 82 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne (3-4 PC, 10-11PC).....	201
Tab. 83 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne – komórki epitelialne (3-5 PC).....	202
Tab. 84 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne – komórki epitelialne (10-17 PC).....	202
Tab. 85 Stężenie początkowe i końcowe- ilość kolonii wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> przy rozcieńczeniu $10^0 - 10^9$ – komórki endotelialne.....	203
Tab. 86 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych – komórki endotelialne.....	204
Tab. 87 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych – komórki endotelialne c. d.....	205
Tab. 88 Stężenie początkowe i końcowe wyselekcjonowanych szczepów klinicznych <i>S.aureus</i> (CFU/ml). Współczynnik ilościowy stęż. końc./stęż. początk. wybranych szczepów klinicznych – komórki endotelialne c.d.....	206
Tab. 89 Szczepy najbardziej i najmniej inwazyjne – komórki endotelialne.....	207
Tab 90. Wyselekcjonowane szczepy kliniczne - najbardziej i najmniej inwazyjne szczepy - komórki endotelialne.....	207
Tab. 91 Ilość koloni szczepów WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu $10^{-1} - 10^{-5}$ w doświadczeniu z genistyną.	208
Tab. 92 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w doświadczeniu z genistyną. Zaznaczono wpływ genistyny na stężenie końcowe szczepów.....	209
Tab. 93 Ilość koloni bakt. WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu $10^{-1} - 10^{-5}$ w translokacji bakteryjnej.....	211
Tab. 94 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.....	212
Tab. 95 Ilość koloni bakt. WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu $10^{-1} - 10^{-5}$ w translokacji bakteryjnej.....	213
Tab. 96 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.....	214
Tab. 97 Ilość koloni bakt. WT, MT i S1400 przy rozcieńczeniu $10^0 - 10^{-5}$ w translokacji bakteryjnej (Transwell poliestrowe i poliwęglowe).....	215
Tab. 98 Stężenie końcowe szczepów WT, MT i S1400 (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej (Transwell poliestrowe i poliwęglowe).....	216

Tab. 99 Ilość koloni bakt. wyselekcjonowanych szczepów klinicznych przy rozcieńczeniu 10^0 – 10^{-8} w translokacji bakteryjnej.....218

Tab. 100 Stężenie końcowe szczepów wyselekcjonowanych szczepów klinicznych (CFU/ml) w translokacji bakteryjnej.....218

Wykaz rycin

Ryc. 1 Schemat pojedynczej warstwy (monolayer) spolaryzowanych komórek epitelialnych (apical surface – powierzchnia apikalna, tight junction – obwódka zamykająca, basolateral surface – powierzchnia bazolateralna).....	25
Ryc. 2 Schemat inwazji bakteryjnej: Salmonella i Shigella.....	25
Ryc. 3 Udział neutrofilów w translokacji bakteryjnej <i>Shigella flexneri</i>	28
Ryc. 4 Pochodzenie wszystkich szczepów gronkowców ze względu na rodzaj materiału.....	76
Ryc. 5 Podział szczegółowy wyizolowanych gronkowców.....	77
Ryc. 6 Oporność szczepów MRSA na wybrane antybiotyki.....	95
Ryc. 7 Wrażliwość szczepów MRSA na wybrane antybiotyki.....	96
Ryc. 8 Oporność szczepów MSSA na wybrane antybiotyki.....	96
Ryc. 9 Antybiogramy szczepów wyizolowanych z rany i krwi.....	98
Ryc. 10 Dominujące typy RFLP.....	102
Ryc. 11 Dendrogram wybranych szczepów <i>S. aureus</i> otrzymany przez porównanie genomowego DNA metodą PFGE. Opracowanie wg programu Molecular Analyst (BioRad).....	112
Ryc. 12 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^4 CFU/ml (14-20).....	121
Ryc. 13 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) z gronkowcem złocistym WT 25923 z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^4 CFU/ml (14-20).....	122
Ryc. 14 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (79-88).....	127
Ryc. 15 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (89-98).....	127
Ryc. 16 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).....	128
Ryc. 17 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współczynnik ilościowy) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).....	128
Ryc. 18 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (79-88).....	130

Ryc. 19 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 (89-98).....	130
Ryc. 20 Średni przyrost transkryptu TNF- α (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).....	131
Ryc. 21 Średni przyrost transkryptu TNF- α (współ. il.) po inkubacji komórek Caco-2 (3-4 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (79-98).....	131
Ryc. 22 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (99-108).....	136
Ryc. 23 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (109-118).....	136
Ryc. 24 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (99-108).....	138
Ryc. 25 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 (109-118).....	138
Ryc. 26 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).....	140
Ryc. 27 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. ilościowy) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).....	140
Ryc. 28 Średni przyrost transkryptu TNFa (wzgl. intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).....	141
Ryc. 29 Średni przyrost transkryptu TNFa (współ. il.) po inkubacji komórek Caco-2 (5-11 dni PC) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC (1×10^9 CFU/ml) w zależności od stężenia komórek bakteryjnych (99-118).....	141
Ryc. 30 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (119-128).....	145
Ryc. 31 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (129-138).....	145

Ryc. 32 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128).....	147
Ryc. 33 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym <i>Staphylococcus aureus</i> , mutantem (MT 10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 (129-138).....	147
Ryc. 34 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (139-148).....	152
Ryc. 35 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 – 10^1 CFU/ml (149-158).....	152
Ryc. 36 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (139-148).....	154
Ryc. 37 Przyrost transkryptu TNF- α po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (149-158).....	154
Ryc. 38 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).....	155
Ryc. 39 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).....	156
Ryc. 40 Średni przyrost transkryptu TNFa (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).....	156
Ryc. 41 Średni przyrost transkryptu TNFa (współ. il. TNFa/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (119-128, 139-148).....	157
Ryc. 42 Średni przyrost transkryptu IL-8 (wzgl. intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).....	157
Ryc. 43 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).....	158
Ryc. 44 Średni przyrost transkryptu TNFa (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).....	158

Ryc. 45 Średni przyrost transkryptu TNFa (ratio TNFa/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 z gronkowcem złocistym MT (10832) z ATCC w zależności od stężenia komórek bakteryjnych 10^9 - 10^1 CFU/ml (129-138, 149-158).....	159
Ryc. 46 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (5×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym <i>Staphylococcus aureus</i> , typem dzikim WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od czasu trwania inkubacji.....	163
Ryc. 47 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (1×10^6 kom./ml) z gronkowcem złocistym <i>Staphylococcus aureus</i> , typem dzikim WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji.....	163
Ryc. 48 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (1×10^6 , 5×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji.....	164
Ryc. 49 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 (1×10^6 , 5×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1 i 3 godz. inkubacji.....	164
Ryc. 50 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2, 3 i 4 godz. inkubacji.....	168
Ryc. 51 Przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji.....	168
Ryc. 52 Średni przyrost transkryptu IL-8 (względna intensywność) po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (39-46).....	169
Ryc. 53 Średni przyrost transkryptu IL-8 (współ. il. IL-8/GAPDH) po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1, 2 i 3 godz. inkubacji (39-46).....	169
Ryc. 54 Przyrost transkryptu TNFa po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od czasu 1, 2, 3, 4 godz. inkubacji (39-47).....	171
Ryc. 55 Przyrost transkryptu TNFa po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1,2 i 3 godz. inkubacji (40-46).....	171
Ryc. 56 Średni przyrost transkryptu TNFa po inkubacji komórek Caco-2 (2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC ($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1,2 i 3 godz. inkubacji (39-46).....	172

Ryc. 57 Średni przyrost transkryptu TNFa po inkubacji komórek Caco-2
(2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923) z ATCC
($3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od 1,2 i 3 godz. inkubacji (39-46).....172

Ryc. 58 Średni przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2
(5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923)
z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności od
1 i 3 godz. inkubacji (1-6) (39-46).....173

Ryc. 59 Średni przyrost transkryptu IL-8 po inkubacji komórek Caco-2
(5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^5 kom./ml) z gronkowcem złocistym WT (25923)
z ATCC ($5,5 \times 10^{12}$ CFU/ml $3,05 \times 10^{12}$ CFU/ml) w zależności
od 1 i 3 godz. inkubacji (1-6) (39-46).....174

Wykaz fotografii

Fot 1. Hodowla komórek Caco-2 w butelce płaskiej (Corning).....	54
Fot 2. Płytko wielodołkowa-dwukomorowa (Transwell).....	74
Fot. 3 Hodowla <i>Staphylococcus aureus</i> na podłożu Chapmana.....	79
Fot. 4 Hodowla <i>Staphylococcus epidermidis</i> na podłożu Chapmana.....	80
Fot. 5 Hodowla <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Staphylococcus epidermidis</i> na podłożu Chapmana.....	80
Fot. 6 Komórki <i>Staphylococcus aureus</i> oglądane pod mikroskopem świetlnym.....	81
Fot. 7 Test probówkowy na obecność koagulazy.....	81
Fot.8 Test krążkowy na nowobiocynę (metoda dyfuzyjno-krążkowa).....	82
Fot. 9 Test biochemiczny API STAPH szczepów nr 8, 9, 18 (SA 98,1%; SA 97,8%; SA 97,8%). Profil numeryczny szczepu nr: (8) <u>6736151</u> , (9) (18) <u>6736153</u>	84
Fot. 10 Test biochemiczny API STAPH szczepów nr 36, 42, 70 (SA 97,8%) Profil numeryczny szczepu nr 36, 42, 70: <u>6736153</u>	84
Fot. 11 Test krążkowy na metycylinę (metoda dyfuzyjno-krążkowa).....	85
Fot.12. Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA izolatów gronkowcowych z krwi, z ran i odbytu (1O, 2K, 3R, 4K, 5K, , 6R) pacjentów z Centrum Leczenia Oparzeń (CLOS).....	106
Fot. 13 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA izolatów gronkowcowych z krwi, z ran (17K,18R,19R, 20K, 21R, 22K, 25R, 26K) pacjentów z CLOS.....	106
Fot . 14 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i ran (12K, 14R, 41K) pacjentów z CLOS.....	107
Fot. 15 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i ran pacjentów z CLOS (47R, 48K,49K) i rany pacjenta z OLO (Rd) (46R).....	107
Fot. 16 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (7R, 35K, 37K, 38K) oraz z rany i odbytu pacjenta z OLO (P) (29O, 30R).....	108
Fot. 17 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLOS (58R, 59O, 60K) oraz z rany (Rd) (50R).....	108
Fot. 18 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLO (S) (53K, 54R, 55K, 62R, 63K) oraz z rany pacjenta (Rd) (52R).....	109
Fot. 19 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLO (S) (71K, 72K, 73O, 74R, 75R, 76K, 77R, 78K, 79R).....	109

Fot. 20 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLO (S) (34K, 36K, 42K, 61K, 64R) oraz (Rd)(45K, 51R, 65R).....	110
Fot. 21 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLO (S) (15K, 16R, 39K, 40K, 69K, 70R) oraz z rany i odbytu pacjentów z OLO (P) (31R, 32R, 33O).....	110
Fot. 22 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i rany pacjentów z CLO (S) (8K, 9K, 43R, 70R) oraz (Rd) (66R, 67R, 68R).....	111
Fot. 23 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi, rany i odbytu pacjentów: A) Z.B. (58R, 59O, 60K), B) W.S. (72K, 73O, 74R) C) W.S. (71K, 73O, 75R).....	113
Fot. 24 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: D) J.D. (3R, 4K), E) M.H. (5K, 6R) F) R.K. (7R, 8K).....	113
Fot. 25 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: G) H.K. (12K, 14R) H) A.S. (15K, 16R) I) T.M. (17K, 18R).....	114
Fot. 26 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: J) P.S. (19R, 20K) K) A.C. (21R, 22K) L) Z.C. (25R, 26K).....	114
Fot. 27 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: Ł) L.H. (42K, 43R) M) H.G. (47R, 48K) N) S.B. (53K, 54R).....	115
Fot. 28 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: O) L.H. (61K, 62R) P) M.W. (63K, 64R) R) L.H. (69K, 70R).....	115
Fot. 29 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z rany i krwi pacjentów: S) A.H. (76K, 77R) T) M.N. (78K, 79R).....	116
Fot. 30 Obraz elektroforezy PFGE chromosomalnego DNA szczepów gronkowcowych z krwi i odbytu pacjenta: U) S.C. (2K, 1O) W) J.S. (30R, 29O).....	116
Fot. 31 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 14-20.....	118
Fot. 32 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./m) po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^4 CFU/ml (14-20).....	119
Fot. 33 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^4 CFU/ml (14-20).....	120
Fot. 34 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 ($5,4 \times 10^5$ kom./ml) po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^4 CFU/ml (14 -20)....	121
Fot. 35 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 79-98.....	124
Fot. 36 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^0 CFU/ml (79-88, 89-98).....	125

Fot. 37 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (79-88, 89-98).....	126
Fot. 38 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z bakteriami o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (79 –88, 89-98).....	129
Fot. 39 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 99-118.....	133
Fot. 40 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (99-108, 110-118).....	134
Fot. 41 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT o stężeniu od 10^9 do 10^1 (99-108, 109-118).....	135
Fot. 42 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (99–108,109-118).....	137
Fot. 43 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 119-138.....	142
Fot. 44 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (WT119-128, MT 129-138).....	143
Fot. 45 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (WT119-128, MT 129-138).....	144
Fot. 46 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (WT119-128, MT 129-138).....	146
Fot. 47 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 139-158.....	149
Fot. 48 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (WT139-148, MT 139-148).....	150
Fot. 49 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (WT 139-148, MT 149-158).....	151

Fot. 50 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNF- α . Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji z gronkowcem złocistym WT i MT o stężeniu od 10^9 do 10^1 CFU/ml (WT139-148, MT 149-158).....	153
Fot. 51 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 1-6.....	160
Fot. 52 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po 1 i 3 godz. inkubacji z gronkowcem złocistym, typem dzikim WT (1-6).....	161
Fot. 53 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji 1 i 3 godz. z gronkowcem złocistym WT (1-6).....	162
Fot. 54 Obraz elektroforezy RNA szczepów nr 39-47.....	165
Fot. 55 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla GAPDH. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po 1 i 3 godz. inkubacji z gronkowcem złocistym WT (39-47, 40-46).....	166
Fot. 56 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla IL-8. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji 1 i 3 godz. z gronkowcem złocistym WT (39 - 47; 40 - 46).....	167
Fot. 57 Obraz elektroforezy produktu reakcji półilościowej RT-PCR dla TNFa. Reakcję przeprowadzono na całkowitym RNA izolowanym z komórek Caco-2 po inkubacji 1, 2, 3, 4 godz. z gronkowcem złocistym WT (39, 41, 43, 45, 47) (40, 42, 44, 46).....	170
Fot. 58 Stężenie końcowe szczepu nr 73 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 73 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i lisostafiną (20 μ g/ml). Szczep oporny na lisostafinę.....	179
Fot. 59 Stężenie końcowe szczepu nr 60 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 60 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i lisostafiną (20 μ g/ml). Szczep oporny na lisostafinę.	179
Fot. 60 Stężenie końcowe szczepu nr 4 - brak kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i lisostafiną (20 μ g/ml). Szczep wrażliwy na lisostafinę.....	179
Fot. 61 Stężenie końcowe szczepu nr 5 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 5 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i gentamycyną (100 μ g/ml). Szczep wrażliwy na gentamycynę.....	180
Fot. 62 Stężenie końcowe szczepu nr 4 - brak kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i gentamycyną (100 μ g/ml). Szczep oporny na gentamycynę.....	180
Fot. 63 Stężenie końcowe szczepu nr 1 - brak kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 1 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 i gentamycyną (100 μ g/ml). Szczep wrażliwy na gentamycynę.....	180

Fot. 64 Stężenie początkowe szczepu nr 48 - ilość kolonii wyselekcjonowanego szczepu klinicznego <i>S.aureus</i> – MRSA nr 48 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-9}	191
Fot. 65 Stężenie końcowe szczepu nr 48 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MRSA nr 48 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 (3-4 PC) oraz (17-18 PC)	191
Fot. 66 Stężenie początkowe szczepu nr 4 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^{-1} – 10^{-9}	192
Fot. 67 Stężenie końcowe szczepu nr 4 - ilość kolonii szczepu klinicznego – MSSA nr 4 przy rozcieńczeniu 10^0 – 10^{-5} po inkubacji z kom. Caco-2 (17-18 PC)	192