

PRODUKCIA BIOFILMU AKO VÝZNAMNÉHO FAKTORA VIRULENCIE U PÔVODCOV ENVIRONMENTÁLNYCH MASTITÍD DOJNÍC PRODUCTION OF BIOFILM AS IMPORTANT VIRULENCE FACTOR OF ENVIRONMENTAL UDDER PATHOGENS IN DAIRY COWS

Milan Vasiľ, Juraj Elečko, František Zigo, Zuzana Farkašová

Abstract: The experiment carried out on 49 species of *Staphylococcus spp.* isolated from cow's milk. Biofilm was determined by growth on CongoRed agar in 36 cases, predominantly in coagulase-negative staphylococci (*S. haemolyticus*, *S. epidermidis*). Tissue culture plate method was performed with 96-well flat-bottomed tissue culture plate. Were detected one species as strongly positive, 13 weakly positive samples, and 35 negative species of *Staphylococcus*. Was not detected presence of gene *bap*. Production of biofilm was determined predominantly in cases of acute 36.11%, and latent 36.11% forms of mastitis. The aim of our study was detection production of biofilm in 49 species of staphylococci from cow's milk by phenotypic and genotypic methods.

Keywords: production of biofilm, CongoRed agar, tissue culture plate, *bap*

ÚVOD

Tvorba biofilmu je významným faktorom virulencie patogénov mliečnej žľazy, ktorý umožňuje prežívanie baktérií jednak vo vonkajšom prostredí a zároveň chráni patogéna pred obrannými mechanizmami hostiteľa, tým sa často podieľa na vzniku a pretrvávajúci subklinických a latentných foriem mastitíd v chovoch dojnic. Biofilm je možné stanoviť u baktérií ako *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*. Koaguláza negatívne stafylokoky ako environmentálne patogény spôsobujú v prevažnej miere subklinické formy mastitíd u dojnic (Schwarz et al., 2010). Ak je subklinická mastitída spôsobená KNS, pretrváva v organizme veľmi dlhú dobu (Taponen et al., 2007).

Produkcia biofilmu je jedným z faktorov, ktorým baktérie inhibujú imunitný systém hostiteľa a spôsobujú tak perzistujúce infekcie mliečnej žľazy (Simojoki et al., 2012). Biofilm chráni patogéna pred obrannými mechanizmami hostiteľa a zároveň pred antimikrobiálnou antibiotickou terapiou (Fey et Olson, 2010). Samotná produkcia biofilmu začína v okamihu adhézie bakteriálneho pôvodcu na povrch hostiteľskej bunky. Umožňuje adhéziu baktérií aj na neživé povrchy v nemocniciach, ustajňovacích priestoroch, umožňuje prežívanie vo vode, ako pitnej, tak aj v prírodných zdrojoch (Donlan et al., 2001). Táto reakcia je spôsobená skupinou proteínov typických pre stafylokoky Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) (Patti et al., 1994, Foster et Hook, 1998). V neposlednom rade sa produkcia biofilmu čoraz častejšie spája s chronickými mastitídami a to zvyšuje jeho dôležitosť predovšetkým z hľadiska identifikácie génov zodpovedných za jeho produkciu (Cucarella et al., 2001; Cucarella et al. 2002).

Cieľom práce bolo otestovanie 49 kmeňov stafylokokov izolovaných z rôznych foriem mastitíd u dojnic a porovnanie kvantitatívnych a kvalitatívnych metód stanovenia.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 49 baktérií patriacich do rodu *Staphylococcus spp.* izolovaných z individuálnych vzoriek kravského mlieka z rôznym foriem mastitíd. Izolácia a identifikácia baktérií bola uskutočnená pomocou klasických mikrobiologických metód a to primokultiváciou na 5 % krvnom agare a následnou kultiváciou na špecifických živných pôdach. Identifikácia jednotlivých druhov bola vykonaná setom STAPHYtest 24, a následne vyhodnotená programom TNW 7.0 ProAuto (PLIVA-Lachema, Brno, ČR). Samotná produkcia biofilmu bola vyhodnotená na základe výsledkov dvoch metód kvantitatívnej rastom na CongoRed agare a semikvantitatívnej rastom na mikrotitračných platničkách. Analýzy boli doplnené o PCR metódu zameranú na zistenie prítomnosti génu zodpovedného za produkciu biofilmu.

Rast na CongoRed agare

Izolované kmene boli kultivované počas 24 h pri 37 °C na špecifickej živnej pôde metódou podľa Freeman et al., 1989, Arciola et al., 2001 a následne vyhodnotené podľa rastu. Čierne, suché kolónie boli považované za pozitívne na produkciu biofilmu. Červené prípadne bordové, lesklé kolónie boli označené ako negatívne. Za dubiózny výsledok možno považovať bordové kolónie s čiernym stredom, ktoré sme však mi nezaznamenali.

Semikvantitatívna metóda rastu na mikrotitračných platničkách

Platničková metóda bola uskutočnená na 96 jamkových mikrotitračných platničkách modifikovanou metódou podľa Christensena, 1985 a vyhodnotená na základe hodnôt absorbancie pomocou ELISA readeru pri 590 nm po ofarbení 4 % kryštál violetou podľa Moore, (2009). Produkcia biofilmu bola posudzovaná ako negatívna, stredne a vysoko pozitívna na základe hodnôt OD a OD_c, pričom hodnota OD bola hodnota vzorky nameraná pri 590 nm, OD_c bola hodnota 3xSD (smerodajná odchýlka) negatívnych kontrol. Negatívna bola vzorka ak hodnota OD bola nižšia ako hodnota OD_c. Pri hodnote OD vyššej ako OD_c, ale zároveň nižšej ako 2xOD_c bola vzorka stredne pozitívna. Ako vysoko pozitívne boli označené kmene s hodnotou OD vyššou ako 2xOD_c.

PCR metóda na stanovenie prítomnosti génu *bap* (biofilm associated protein)

Zo všetkých 49 kmeňov bola DNA separovaná pomocou QiAMP tissue kit-u (QIAGEN, Hilden, Germany). a následne použitá na stanovenie prítomnosti génov kódujúcich produkciu biofilmu pomocou metódy PCR. PCR amplifikácia časti génu *bap* bola stanovená pomocou primera *bap* F 3'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATT-5', *bap*R 5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3' v termocykleri s počiatočnou denaturáciou pri 94 °C počas 30 s, následne 30 cyklov (45 s. 94 °C, 1 min. 62 °C, 1 min. 72 °C), a konečnou polymerizáciou počas 7 min. pri 72 °C (Seo et al., 2008). Veľkosť PCR produktu (971bp) bol následne analyzovaný elektroforézou na 1 % agarózovom géle. V ďalších experimentoch bude stanovená prítomnosť viacerých génov ovplyvňujúcich tvorbu biofilmu (*icaAB*, *eno*, *bbp*, *clfA*, *clfB*, *fib*) vo vzorkách kravského aj ovčieho mlieka. Kmene boli vyhodnotené ako pozitívne resp. negatívne na prítomnosť génu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našom experimente bola tvorba biofilmu stanovená u 49 baktérií rodu *Staphylococcus spp.* z kravského mlieka (*S. haemolyticus* – 18, *S. warneri* – 10, *S. epidermidis* – 9, *S. aureus* – 8, *S. chromogenes* – 3 a *S. piscifermentas* – 1) dvoma metódami z kvalitatívneho aj kvantitatívneho hľadiska. Pri vyhodnotení rastu na CongoRed agare boli pri *S. aureus*, *S. epidermidis* a *S. piscifermentas* všetky vzorky pozitívne. Kmene *S. haemolyticus* boli pozitívne v 83,3% (15/18), z kmeňov *S. warneri* bolo 30 % pozitívnych (3/10). Semikvantitatívnou metódou bol jeden kmeň *S. epidermidis* vyhodnotený ako vysoko pozitívny, 13 kmeňov ako stredne pozitívne (najviac *S. haemolyticus* 8/10) a 35 kmeňov ako negatívne (Tabuľka 1).

Baktérie boli izolované z rôznych foriem mastitíd v prevažnej miere z akútnych (n=19), latentných (n=15), subklinických (n=8) a subakútnych (n=7). Kvantitatívnou metódou rastu na CongoRed agare bolo potvrdených 36 pozitívnych kmeňov izolovaných v rovnakom počte z akútnych aj latentných foriem (36,11%). Rovnaký pomer pozitívnych bol zaznamenaný aj pri subakútnych a subklinických formách (13,9 %). Semikvantitatívna metóda na určenie produkcie biofilmu bola uskutočnená na mikrotitračných platničkách s vyhodnotením po ofarbení ELISA metódou. Kmene boli posudzované ako negatívne, stredne pozitívne a vysoko pozitívne. Pozitivita kmeňov u dojnic bola zistená v 14 prípadoch, z toho jeden kmeň bol vyhodnotený ako vysoko pozitívny (*S. epidermidis* pochádzajúci z akútnej mastitídy) a 13 stredne pozitívnych predovšetkým izolovaných z klinických prípadov mastitíd. Najvyššia pozitivita bola zaznamenaná pri akútnych mastitídach (64,3 %), pri subakútnych a subklinických rovnako (14,3 %), pričom všetky kmene boli označené ako stredne pozitívne (Tabuľka 2). Zo všetkých 49 kmeňov bola izolovaná DNA použitá na stanovenie prítomnosti génov zodpovedných resp. ovplyvňujúcich tvorbu biofilmu. V našom prípade bola PCR metódou stanovená prítomnosť génov *bap* (biofilm associated protein), ktorá však nebola potvrdená ani v jednom prípade, čo potvrdzujú viacerí autori zaoberajúci sa danou problematikou (Seo et al., 2008; Simojoki et al., 2012).

Tabuľka 1 Porovnanie metód stanovenia produkcie biofilmu u kmeňov *Staphylococcus spp.* izolovaných zo vzoriek kravského mlieka

Pôvodcovia	n	CRA			SPM			<i>bap</i>
		P	N	VP	SP	N		
<i>S. aureus</i>	8	8	0	0	1	7	0/8	
<i>S. epidermidis</i>	9	9	0	1	1	7	0/9	
<i>S. haemolyticus</i>	18	15	3	0	8	10	0/18	
<i>S. chromogenes</i>	3	0	3	0	0	3	0/3	
<i>S. piscifermentas</i>	1	1	0	0	0	1	0/1	
<i>S. warneri</i>	10	3	7	0	3	7	0/10	
Spolu	49	36	13	1	13	35	0/49	

CRA- rast na CongoRed agare; SPM- semikvantitatívna platničková metóda; P- pozitívne; N- negatívne; VP- vysoko pozitívne; SP- stredne pozitívne; x/x- negatívne/pozitívne na prítomnosť génu

Tabuľka 2 Porovnanie metód stanovenia produkcie biofilmu u kmeňov *Staphylococcus spp.* izolovaných z rôznych foriem mastitíd

Forma mastitídy	n	CRA			SPM		
		P	N	VP	SP	N	
Akútna	19	13	6	0	9	10	
Subakútna	7	5	2	0	2	5	
Subklinická	8	5	3	0	2	6	
Latentná	15	13	2	1	0	14	
Spolu	49	36	13	1	13	35	

CRA- rast na CongoRed agare; SPM- semikvantitatívna platničková metóda; P- pozitívne; N- negatívne; VP- vysoko pozitívne; SP- stredne pozitívne

ZÁVER

V našom experimente bola produkcia biofilmu oboma metódami potvrdená v 9 prípadoch, kmene pochádzali zo vzoriek izolovaných z akútnych a subakútnych mastitíd. Kvantitatívnou metódou rastu na CongoRed agare bolo potvrdených 36 pozitívnych kmeňov izolovaných v rovnakom počte z akútnych aj latentných foriem (36,11 %). Semikvantitatívnou metódou na mikrotitračných platničkách bola pozitivita potvrdená v 14 prípadoch, z toho jeden kmeň bol vyhodnotený ako vysoko pozitívny (*S. epidermidis* pochádzajúci z akútnej mastitídy) a

13 stredne pozitívnych predovšetkým izolovaných z klinických prípadov mastitíd. Prítomnosť génu *bap* kódujúceho produkciu biofilmu nebola zaznamenaná ani v jednom prípade. Na základe výsledkov experimentu je možné konštatovať, že produkcia biofilmu ako faktora virulencie prevažne u KNS je aktuálnym problémom pri pretrvávajúcom výskyte subklinických a latentných mastitíd v chovoch dojníc, ktoré v značnej miere ovplyvňujú nielen produkciu a kvalitu mlieka, ale aj celkovú rentabilitu chovov dojníc.

LITERATÚRA

- ARCIOLA, C. R., BALDASSARRI, L., MONTANARO, L., 2001. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of *Staphylococcal* Strains from Catheter-Associated Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2151–2156.
- CUCARELLA, C., COLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I., PENADES, P., 2001. *bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. In *J. Bacteriol.* 183, 2888–2896.
- CUCARELLA, C., TORMO, M. A., KNECHT, E., AMORENA, B., LASA, I., FOSTER, T. J., PENADES, J. R., 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. In *Infect. Immun.* 70, 3180–3186.
- DONLAN, R. M., MURGA, R., BELL, M., TOSCANO, C. M., CARR, J. H., NOVICKI, T. J., 2001. Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. In *J. Clin. Microbiol.* 39, 750–753.
- FEY, P. D., OLSON, M. E., 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. In *Future Microbiology* 5, 917–933.
- FREEMAN, D. J., FALKINER, F. R., KEANE, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. In *J. Clin. Pathol.* 42, 872–874.
- FOSTER, T.J., HOOK, M., 1998. Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. In *Trends Microbiol.* 6, 484–488.
- CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., BADDOUR, L. M., BARRETT, F. F., D M MELTON D. M., BEACHEY, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. In *J. Clin. Microbiol.* 22 (6), 996.
- MOORE, G. E., 2009. Biofilm Production by *Streptococcus uberis* associated with Intramammary Infections. University of Tennessee Honors Thesis Projects. http://trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj/1299
- PATTI, J. M., ALLEN, B. L., MCGAVIN, M. J., HOOK, M., 1994. MSCRAMM mediated adherence of microorganisms to host tissue. In *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 585–617.
- SEO, Y. S., LEE, D. Y., RAYAMAHJI, N., KANG, M. L., YOO, H. S., 2008. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus spp.* isolated from animals and air. In *Research in Veterinary Science* 85, 433–438.
- SCHWARZ, D., DIESTERBECK, U. S., FAILING, K., KONIG, S., BRUGEMANN, K., ZSCHOCK, M., WOLTER, W., CZERNY, C. P., 2010. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany – a longitudinal study. In *Journal of Dairy Science.* 93, 5716– 5728.
- SIMOJOKI, H., HYVÖNEN, P., PLUMED FERRER, C., S. TAPONEN, S., PYÖRÄLÄ, S., 2012. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? In *Vet Microbiol.* 158 (3-4), 344-352.
- TAPONEN, S., KOORT, J., BJÖRKROTH, J., SALONIEMI, H., PYÖRÄLÄ, S., 2007. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. In *Journal of Dairy Science,* 90, 3301–3307.

Pod'akovanie: Práca bola podporovaná projektom APVV-0679-10 a projektom APVV-0629-07

Kontaktná adresa: doc. MVDr. Milan Vasiľ, CSc., Ústav chovu zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice, vasil@uvm.sk