

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Dorota Demjanko

**Patogenezės mechanizmų ir bioplėvelės formavimo faktorių
nustatymas meticilinui atspariuose *Staphylococcus aureus*
(MRSA) kamienuose**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovė

Dr. Tatjana Kirtiklienė

Darbas atliktas

GMC Biomokslų instituto

Prokariotų molekulinės mikrobiologijos ir
taksonomijos laboratorijoje

Vilnius, 2025

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> patogenezės mechanizmai	7
1.2. <i>S. aureus</i> atsparumas antibiotikams	16
1.3. MRSA bioplėvelių formavimo faktoriai	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	29
2.1. Darbe naudotos medžiagos ir reagentai	29
2.2. Darbe naudota įranga	30
2.3. Darbe naudoti bakterijų izoliatai	30
2.4. Polimerazės grandininėi reakcijai (PGR) naudoti pradmenys	30
2.5. Bendra tyrimo eiga ir vykdymo etapai	32
2.6. MRSA identifikavimas	33
2.7. Fenotipinis virulentiškumo faktorių nustatymas	34
2.8. Virulentiškumo genų nustatymas	36
2.9. MRSA bioplėvelių formavimo kiekybinis įvertinimas	37
2.10. Statistinė analizė	38
3. REZULTATAI	39
3.1. Tiriamų MRSA kamienų bendra charakteristika	39
3.2. Genetinių patogenezės mechanizmų ir bioplėvelių formavimo faktorių paplitimas klinikiniuose MRSA izoliatuose	40
3.3. Ryšys tarp genetinių virulentiškumo faktorių ir MRSA bioplėvelių formavimo stiprumo	44
3.4. Fenotipinių virulentiškumo faktorių paplitimas bei jų ryšys su MRSA gebėjimu formuoti bioplėveles	48
3.5. Genetinių ir fenotipinių virulentiškumo veiksnių tarpusavio sąsajos	49
4. REZULTATŲ APTARIMAS	57

4.1. Patogenezės mechanizmus koduojančių genų paplitimas	57
4.2. Patogenezės mechanizmus koduojantys genai ir MRSA gebėjimas formuoti bioplėveles	58
4.3. Bioplėvelių formavimą lemiantys genai ir MRSA gebėjimas formuoti bioplėveles.....	60
4.4. Ekstraląstelių fermentų ir sideroforų sąveika su virulentiškumo genais	62
IŠVADOS.....	65
REKOMENDACIJOS.....	66
AUTORIAUS ASMENINIS INDĖLIS	67
REZULTATŲ SKLAIDA.....	68
SANTRAUKA	69
ABSTRACT	70
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	71

SANTRUMPOS

AAM – antimikrobinis atsparumas

BlaZ – β -laktamazė

BVP – bendrasis vidaus produktas

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Enterobacter*

ET – eksfoliaciniai toksinai

GlcNAc – N-acetilgliukozaminas

Ig – imunoglobulinai

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

LĮ-MRSA – ligoninėje įgytas meticilinui atsparus *S. aureus*

MSSA – meticilinui jautrus *Staphylococcus aureus*

MurNAc – N-acetilmuramo rūgštis

OT₅₈₀ - optinis tankis matuotas spektrofotometru 580 nm bangos ilgio diapazone

OTK₅₈₀ – koreguotas optinis tankis matuotas spektrofotometru 580 nm bangos ilgio diapazone (neigiamos kontrolės optinio tankio vidurkis ir jo trijų standartinių nuokrypių vertė)

PBP – peniciliną surišantis baltymas

PIA – tarpląstelinės adhezijos polisacharidas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PSM – fenolyje tirpūs modulinai

PVL – Pantono–Valentino leukocidinas

SAg – superantigenai

SAL – *Staphylococcus aureus* lipazė

SpA – stafilokokinis baltymas A

TŠS – toksinio šoko sindromas

TŠST – toksinio šoko sindromo toksinas

VĮ-MRSA – visuomenėje įgytas meticilinui atsparus *S. aureus*

IVADAS

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) yra oportunistinis patogenas, galintis sukelti įvairias infekcijas – nuo lengvų odos pažeidimų iki gyvybei pavojingų būklių, tokių kaip pneumonija, endokarditas ar sepsis (Monique R. Bennett ir kt., 2020). Tai lemia itin kompleksinis *S. aureus* virulentiškumas, kuris apima daugybę tarpusavyje susijusių mechanizmų, leidžiančių bakterijai prisitaikyti prie aplinkos, išvengti šeimininko imuninės sistemos, efektyviai kolonizuoti audinius bei ardyti šeimininko ląsteles, skatinant uždegiminius procesus (Rahima Touaitia ir kt., 2025; Abayeneh Girma, 2024).

Ypatingą klinikinę reikšmę turi meticilinui atsparūs *S. aureus* (MRSA) kamienai, kurie dėl savo atsparumo β -laktaminiams antibiotikams apsunkina infekcijų gydymą ir yra susiję su padidėjusiu sergamumu bei mirštamumu visame pasaulyje (Assefa Asnakew Abebe ir kt. 2023). Naujausi duomenys rodo, kad 2021 m. 4,71 mln. mirčių buvo susijusios su bakteriniu AAM, o MRSA vis dar išlieka pagrindinė šių mirčių priežastis. Prognozuojama, kad iki 2050 m. pasaulinės išlaidos AAM padariniams mažinti gali siekti 1 trilijoną Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) dolerių. Dėl to efektyvių gydymo strategijų paieška, ypač susijusi su MRSA, išlieka vienu aktualiausių visuomenės sveikatos uždavinių (European Centre for Disease Prevention and Control, 2024; Naghavi Mohsen ir kt., 2024).

Vienas svarbiausių MRSA patogenezės aspektų – bioplėvelės formavimas (Rafik Aniba ir kt., 2024). Bioplėvelė – tai mikroorganizmų bendruomenė, įsiterpusi į ekstrapolimerinę matricą, kuri ne tik padeda bakterijoms tvirtai prisitvirtinti prie paviršių, bet ir suteikia atsparumą antibiotikams bei imuniniam atsakui. Bioplėvelės formavime dalyvauja specifiniai baltymai, polisacharidai, bei fermentai prisidedantys prie audinių kolonizacijos ir struktūros formavimo (Qi Peng ir kt., 2022; Xiyong Wu ir kt., 2024).

Lietuvoje šios srities tyrimų yra labai mažai, ypač tokių, kurie kompleksškai nagrinėtų MRSA klinikinių izoliatų genetinį virulentiškumo profilį kartu su jų fenotipinėmis savybėmis, įskaitant gebėjimą formuoti bioplėveles. Dažniausiai tyrimai apsiriboja pavieniais genais ar mažais izoliatų skaičiais (Žaneta Maželienė ir kt., 2022; Agnė Kirkliauskienė ir kt., 2024). Išsamių analizių, kurios jungtų genų buvimą su bioplėvelės formavimu, ypač trūksta. Šiame darbe buvo tirti 22 MRSA virulentiškumo genai ir 5 fenotipiniai virulentiškumo veiksniai, įskaitant gebėjimą formuoti bioplėveles. Tai pirmas Lietuvoje tyrimas, kuris apima didesnę MRSA klinikinių izoliatų skaičių ir nagrinėja tokį platų genetinį virulentiškumo veiksmų spektrą. Tokios analizės būtinos ne tik geriau suprasti MRSA virulentiškumą, bet ir gali prisidėti prie efektyvesnių infekcijų kontrolės bei gydymo strategijų kūrimo.

Darbo tikslas:

Nustatyti patogenezės mechanizmų ir bioplėvelių formavimo faktorius iš hospitalizuotų pacientų grupių išskirtų meticilinui atsparių *Staphylococcus aureus* (MRSA) izoliatų.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti genetinių patogenezės mechanizmų ir bioplėvelių formavimo faktorių paplitimą klinikiniuose MRSA izoliatuose.
2. Įvertinti ryšį tarp klinikiniuose MRSA izoliatuose nustatytų genetinių virulentiškumo faktorių bei bioplėvelių formavimo stiprumo.
3. Nustatyti fenotipinių virulentiškumo faktorių paplitimą bei jų ryšį su MRSA gebėjimu formuoti bioplėveles.
4. Įvertinti genetinių ir fenotipinių virulentiškumo veiksnių tarpusavio sąsajas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 *Staphylococcus aureus* patogenezės mechanizmai

1.1.1. Bendra *Staphylococcus aureus* charakteristika

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) – tai gramteigiama bakterija, žmogaus normalios mikrobiotos dalis, dažniausiai randama nosies ertmėje ir ant odos. Mikroorganizmas gali kolonizuoti žmogų be jokių infekcijos požymių ar simptomų. Suaugusių sveikų žmonių populiacijoje toks *S. aureus* paplitimas siekia 20-30 proc. (Thomas E. Locke ir kt., 2025) Tačiau pažeidus gleivinę ar odos barjerą, ši bakterija gali sukelti įvairias sunkias infekcijas, įskaitant endokarditą, bakteremiją, osteomielitą, odos ir minkštųjų audinių infekciją bei pneumoniją (Monique R. Bennett ir kt., 2020).

Žinoma, kad *S. aureus* infekcijos dažniausiai prasideda nuo besimptomės kolonizacijos. *S. aureus* bakterijas nešiojantys asmenys gali jas perduoti oro lašeline būdu, taip pat tiesioginio ar netiesioginio kontakto metu – per užterštą odą, rankas, asmeninės higienos priemones ar įvairius aplinkos paviršius. Šios bakterijos geba išgyventi net kelis mėnesius sausose aplinkos sąlygose (Gordon Y C Cheung ir kt., 2021). Sunkiausios *S. aureus* sukeltos infekcijos dažniausiai pasireiškia ligoninėse. Sveikatos priežiūros įstaigose infekcijų plitimui palankias sąlygas sudaro bendros pacientų patalpos, nusilpusi pacientų imuninė sistema ir invazinės medicininės procedūros, kurios skatina greitą *S. aureus* plitimą (Nicholas Tsouklidis ir kt., 2020; Muhammad Shoaib ir kt., 2023;).

S. aureus yra puikus pavyzdys itin prisitaikančio oportunistinio patogeno, galinčio pereiti nuo nekenksmingo žmogų kolonizuojančio mikroorganizmo iki pavojingo invazinio sukėlėjo. Tai lemia specifinės *S. aureus* savybės – gebėjimas išskirti daugybę virulentiškumo veiksnių, išvengti šeimininko imuninės sistemos ir išvystyti atsparumą įvairiems antibiotikams (Girma, 2025; Rahima Touaitia ir kt. 2025). Sisteminei *S. aureus* infekcijai dažnai pradžia duoda bakterijos patekimas per pažeistos odos apsauginį barjerą arba per bioplėveles, susiformavusias ant invazinių medicininių prietaisų paviršių. Patekusios į kraujotaką, bakterijos gali aktyviai aptikti ir naikinti imuninės sistemos ląsteles, tokias kaip neutrofilai, pasitelkdamos citolizinius toksinus, arba – alternatyviai – išlikti šiose ląstelėse, taip pasiekdamos sisteminį pasiskirstymą organizme. Perėjimas per kepenis, kur bakterijos susiduria su Kupferio ląstelių fagocitiniu aktyvumu, yra laikomas svarbiu etapu tolimesnei sisteminei infekcijos eigai. Jei bakterijos išgyvena šį etapą, jos gali toliau cirkuliuoti kraujotakoje, prisitvirtinti prie audinių ląstelių ir į jas patekti, ką daugiausia lemia paviršiniai baltymai. Vėlesnis abscesų formavimasis priklauso nuo įvairių virulentiškumo veiksnių, įskaitant specifinius paviršinius baltymus, toksinus ir superantigenus bei fermentus (Gordon Y C Cheung ir kt., 2021).

S. aureus pasižymi dideliu genetiniu plastiškumu – jis geba įgyti naują genetinę informaciją per horizontalų genų perdavimą, mobiliuosius genetinius elementus, tokius kaip plazmidės, transpozonai ar patogeniškumo salelės, bei bakteriofagus. Dėl šių mechanizmų susiformuoja platus ir dažnai tarpusavyje besidubliuojantis virulentiškumo veiksnių rinkinys (Jodi A. Lindsay, 2019)

Pastaraisiais metais pasikeitė požiūris į *S. aureus* kaip tik į ekstraląstelinį patogeną – dabar jis taip pat laikomas fakultatyviniu viduląstelinio mikroorganizmu. Įrodyta, kad *S. aureus* gali patekti tiek į makrofagus, tiek į epitelio ar endotelio ląsteles. Šis viduląstelinis etapas ypač svarbus klinikoje prasme – jis leidžia bakterijoms ilgai išlikti audiniuose, apsisaugoti nuo imuninės sistemos bei įgyti atsparumą antibiotikams, ypač tiems, kurie prasčiau prasiskverbia į ląsteles (Gordon Y C Cheung ir kt., 2021). Todėl *S. aureus* virulentiškumas yra ypač kompleksinis, grindžiamas gebėjimu prisitaikyti, išvengti imuninės sistemos, išlikti ląstelėse ir efektyviai kolonizuoti audinius. Pagrindiniai virulentiškumo veiksniai ir mechanizmai apima adhezijos molekules, kurios leidžia bakterijai prisitvirtinti prie šeimininko audinių, baltymus, leidžiančius išvengti šeimininko imuninės sistemos bei agresyvius toksinus ir fermentus, kurie ardo šeimininko ląsteles ir audinius (Abayeneh Girma, 2025).

1.1.2. *S. aureus* adheziniai

Viena pagrindinių *S. aureus* virulentiškumo savybių – gebėjimas gaminti įvairius adheziją skatinančius baltymus, kurie padeda bakterijai prisitvirtinti prie šeimininko ląstelių ir audinių (Nicoletta Schwermann ir kt. 2023). Šis patogenas aprūpintas įvairiais ekstraląsteliniais komponentais, sąveikaujančiais su šeimininko kolagenu, fibronektinu ir fibrinogenu:

- Kolagenas yra pagrindinis jungiamojo audinio komponentas, ir *S. aureus* gali prie jo prisijungti, kad galėtų prasiskverbti giliau ir kolonizuoti audinius (Gordon Y C Cheung ir kt., 2021).
- Fibronektinas - baltymas, randamas daugelyje audinių ekstraląstelinėje matricoje, veikia kaip *S. aureus* prisijungimo vieta, padeda bakterijai prisitvirtinti ir kolonizuoti šeimininko audinius (Casey M Gries ir kt. 2020).
- Sąveika su fibrinogenu, vykstanti per *S. aureus* paviršiaus baltymus, aktyvuoja kraujo krešėjimo kelius, o bakterija geba pasinaudoti susidariusiais krešuliais, kad išvengtų imuninės sistemos ir sukeltų infekciją (Nicoletta Schwermann ir kt. 2023).

Prisijungimas prie gyvų (biotinių) paviršių vyksta per su ląstelės sienele susijusius baltymus. Tokie baltymai, kurie geba prisitvirtinti prie šeimininko ekstraląstelinės matricos dar vadinami MSCRAMM grupės baltymais (angl. *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Yra apie 20 skirtingų MSCRAMM baltymų, kurie kovalentiškai jungiasi prie peptidoglikano. Tarp jų: sukibimo faktoriai (ClfA, ClfB), fibronektiną surišantys baltymai (FnBP),

kolageną surišantis baltymas (Cna), stafilokokinis baltymas A (Spa) ir kapsulė (Mohammed Alorabi ir kt., 2023). Manoma, kad *S. aureus* gebėjimas ekspresuoti daug skirtingų MSCRAMM yra svarbus virulentiškumo veiksnys ir padeda bakterijai išgyventi bei sukelti infekcijas. Šių baltymų įvairovė leidžia patogenui įvairiai sąveikauti su šeimininko audiniais ir išvengti imuninės sistemos. Šiuos baltymus koduojančių genų nustatymas padeda įvertinti *S. aureus* virulentiškumą. Todėl šie genai yra svarbūs bakterijų tyrimuose, ypač kai nėra galimybės analizuoti viso genomo. Pastebėta, kad *S. aureus* kamienai, neturintys šių genų, yra mažiau virulentiški. Visi šie baltymai skatina prisitvirtinimą ir padeda *S. aureus* išgyventi kraujotakoje, todėl bakterija gali sukelti ne tik paviršines, bet ir sisteminės infekcijas (Abayeneh Girma, 2025).

1.1.3. *S. aureus* veiksniai, leidžiantys išvengti imuninės sistemos

Patogeninės bakterijos turi gebėti įveikti mechaninius barjerus, atlaikyti cirkuliuojančių antimikrobinių medžiagų poveikį bei išvengti šeimininko imuninės sistemos, kad galėtų išgyventi ir plisti. Mikroorganizmo gebėjimas slopinti, apeiti ar atlaikyti imuninės sistemos atsaką lemia jo virulentiškumą. Atsižvelgiant į šiuos aspektus, *S. aureus* yra išskirtinai virulentiškas patogenas (Gordon Y. C. ir kt., 2021).

Neutrofilai yra gausiausia baltųjų kraujo kūnelių (leukocitų) rūšis, sudaranti apie 60 proc. visų leukocitų ir atliekanti svarbų vaidmenį imuninėje sistemoje. Neutrofilai pirmieji reaguoja į infekcijas ar audinių pažeidimus. Jie aptinka bakterijas ir jas fagocituoja (Mallary Greenlee-Wacker ir kt., 2016). *S. aureus*, norėdamas sėkmingai egzistuoti kaip žmogaus mikrobiotos dalis, išvystė gebėjimą slopinti pagrindines neutrofilų funkcijas, tokias kaip chemotaksis ir fagocitozė. Tam jis naudoja įvairius toksinus ir membraninius baltymus, kurie blokuoja chemokinų signalų perdavimą ir imuninių ląstelių migraciją į infekcijos vietą (Gordon Y. C. ir kt., 2021). Galima išskirti pagrindinius būdus, kuriais *S. aureus* geba išvengti šeimininko imuninės sistemos:

1) Slopindamas neutrofilų judėjimą iš kraujotakos į audinius, jų aktyvavimą ir chemotaksį - apie 60 proc. *S. aureus* kamienų išskiria chemotaksį inhibuojantį baltymą (CHIPS). Šis baltymas jungiasi su neutrofilų paviršiaus receptoriais (C5aR ir FPR), taip blokuodamas signalus, reikalingus jų pritraukimui į uždegimo vietą. Eap (išorinis adhezijos baltymas) trukdo neutrofilų išėjimui iš kraujagyslių per sąveiką su endotelio ląstelėmis. Stafilokokinis superantigeną primenantis baltymas 5 (SSL5) ir superantigenas SelX jungiasi prie leukocitų paviršiuje esančio ligando (PSGL-1) ir trukdo neutrofilų adhezijai prie endotelio, taip slopindami jų judėjimą link infekcijos vietos. SSL šeimos baltymai (pvz., SSL3, SSL4, SSL5, SSL10) blokuoja TLR2, GPCR, CXCR4 receptorius – tai slopina neutrofilų aktyvaciją.

Be to, *S. aureus* išskiria fermentus proteazę ir lipazę, kurie trukdo neutrofilų judėjimui į uždegimo vietą. Stafopainas (proteazė) suardo receptorių CXCR2, todėl neutrofilai nebegali reaguoti

į tam tikrus jų judėjimą skatinančius citokinus. Tuo tarpu lipazė skaido lipoproteinus. *S. aureus* pats skaido savo lipoproteinus naudodamas Geh lipazę, kuri pašalina uždegimą skatinančią dalį. Tokiu būdu bakterija sąmoningai slepia save nuo imuninės sistemos, ypač nuo neutrofilų, kurie paprastai atpažįsta tokius bakterijų komponentus – vadinamuosius PAMP (su patogenų susijusios molekulės) (Nienke W. M. de Jong ir kt., 2019; Gordon Y. C. ir kt., 2021; Fernanda S. Rasquel-Oliveira ir kt., 2025).

2) Slopindamas fagocitozę per agregaciją, apsaugines paviršiaus struktūras bei bioplėvelių formavimą - polisacharidinė kapsulė laikoma vienu svarbiausių virulentiškumo veiksnių, padedančių *S. aureus* išgyventi šeimininko ląstelėse slopinant fagocitozės procesą. Tačiau nustatyta, kad kapsulė padidina *S. aureus* virulentiškumą tik kai kurių infekcijų metu, pavyzdžiui, bakteremijos atveju, bet kitose situacijose, pavyzdžiui, endokardito metu, kapsulė gali būti nenaudinga ar net trukdyti, nes uždengia adhesinus. Tai gali apsunkinti prisitvirtinimą prie širdies audinių, o tai yra svarbu širdies vožtuvų infekcijos vystymuisi (Gordon Y. C. ir kt., 2021).

Kita svarbi apsauga yra tarpląstelinės adhezijos polisacharidas (PIA), esantis ant bakterijos paviršiaus. Šis egzopolisacharidas yra pagrindinė stafilokokų bioplėvelių matricos statybinė medžiaga. Bioplėvelės yra ypač efektyvus mechanizmas, slopinantis fagocitozę. Kaip ir kapsulė, PIA nėra gaminamas visų *S. aureus* kamienų, todėl svarbu pabrėžti kitų veiksnių svarbą, siekiant išvengti fagocitozės (Qi Peng ir kt., 2023).

Be bioplėvelių, *S. aureus* turi dar vieną mechanizmą: bakterija geba suformuoti trombus. Kad išvengtų šeimininko imuninės sistemos ląstelių atpažinimo, *S. aureus* paviršiaus baltymai jungiasi su kraujo baltymais. *S. aureus* sudarydamas koaguliazės, vWbp baltymo ir protrombino kompleksą stafilotrombiną, skaido fibrinogeną ir suformuoja fibrino krešulius, net jei nėra kraujagyslių pažeidimo. Toliau *S. aureus* naudoja fibrinogeną jungiančius baltymus, tokius kaip ClfA, kad prikibtu prie fibrino krešulių ir formuotų fibrino turinčias bakterijų sankaupas. Fibronektiną surišantys baltymai FnBPA ir FnBPB taip pat skatina trombocitų agregaciją. Tokiu būdu bakterija užsidengia fibrininiu dangalu, t.y. paties žmogaus molekulėmis, ir tada žmogaus imuninės sistemos ląstelės jau visiškai neatpažįsta bakterijos (Casey M Gries ir kt., 2020).

3) Trikdydamas opsonizaciją - *S. aureus* naudoja kelis mechanizmus, kad slopintų opsonizaciją, kuri yra būtina veiksmingai fagocitozei. Opsonizacija apima bakterijų tikslų ženklinimą antikūnais (imunoglobulinais (Ig)) arba komplemento aktyvavimą. Ig jungiasi prie patogenų per savo F(ab) segmentus ir prie fagocitų per F(c) regioną, skatindami klasikinį ir lektino komplementų kelius. Yra nustatyta, kad *S. aureus* išvystė mechanizmus, padedančius išvengti komplemento sistemos veikimo, gamindamas įvairius baltymus, kurie gali pakeisti ar paveikti komplemento kaskados etapus (Nienke W. M. de Jong ir kt., 2019).

S. aureus gamina du paviršiaus baltymus, kurie keičia IgG funkciją. Pirmasis iš jų – tai stafilokokinis baltymas A (SpA), o antrasis – stafilokokinis imunoglobulinų surišimo baltymas (Sbi). Baltymas A (SpA), sukuria „kamufliuotą“ apvalkalą, jungdamasis prie IgG F(c) regiono, tokiu būdu padengdamas bakterijos paviršių IgG antikūnais. Tai apsunkina bakterijos atpažinimą ir leidžia jai išvengti imuninės sistemos atsako. SpA taip pat veikia kaip B ląstelių superantigenas, sukeldamas B ląstelių apoptozę. Sbi baltymas taip pat jungiasi su IgG ir blokuoja fagocitozę per Fc receptorius (Nienke W. M. de Jong ir kt., 2019).

4) Tiesiogiai slopindamas pagrindines neutrofilų funkcijas - kai neutrofilams pavyksta fagocituoti *S. aureus* bakterijas, nepaisant daugybės jų išvengtų fagocitozės mechanizmų, šios bakterijos patenka į neutrofilų fagosomas, kur neutrofilai naikina bakterijas dviem pagrindiniais būdais: nuo deguonies priklausomu (gaminant reaktyvias deguonies formas) ir nepriklausomu (gaminant antimikrobinis peptidus). Norėdamas išgyventi, *S. aureus* pasitelkia kelis apsaugos būdus: neutralizuoja reaktyvias deguonies formas, apsisaugo keisdamas savo paviršiaus krūvį - taip trukdo prisijungti antimikrobinis peptidams ir apsunkina lizocimo veikimą (Viktoria Rungelrath ir kt., 2021).

5) Tiesiogiai naikindamas neutrofilus gaminant toksinus arba inicijuodama neutrofilų apoptozę - *S. aureus* ne tik pasyviai vengia žūtį nuo neutrofilų, bet ir aktyviai naikina šias imuninės sistemos ląsteles naudodamas toksinus. Pagrindiniai toksinai yra α -toksinas, dvikomponenčiai leukocidiniai (Pantonio Valentino leukocidiniai (PVL) - LukS ir LukF; LukDE; LukAB; γ -toksinas (γ -hemolizinas)) ir fenolyje tirpūs modulinai (PSM). Galiausiai, *S. aureus* gali skatinti natūralią neutrofilų mirtį – apoptozę. Toks veikimo būdas leidžia bakterijai slopinti imuninį atsaką net nenaikinant ląstelių tiesiogiai (Nienke W. M. de Jong ir kt., 2019).

Manoma, kad ypač veiksmingi yra paskutiniai du būdai, kurie yra nepriklausomi nuo opsonizacijos. Būtent šie mechanizmai gali būti pagrindinė priežastis, kodėl iki šiol nepavyko sukurti veiksmingos vakcinos nuo *S. aureus* (Viktoria Rungelrath ir kt., 2021; Fernanda S Rasquel-Oliveira ir kt., 2025; JR Caldera ir kt., 2024).

1.1.4. *S. aureus* toksinai ir superantigenai

S. aureus virulentiškumas reikšmingai priklauso nuo įvairių išskiriamų toksinų. Skirtingai nei anksčiau paminėti virulentiškumo faktoriai, toksinai yra labiau specifiniai. Skirtingi kamieniai gali arba turėti arba neturėti toksinų. Jie gali būti produkuojami ne po vieną, o ištisomis grupėmis. Be to, bakterijos gali turėti skirtingas toksinų kombinacijas. Galima išskirti pagrindines *S. aureus* toksinų grupes: poras formuojantys toksinai, eksfoliaciniai toksinai (ET) ir superantigenai (SAg). Tikėtina, kad įvairūs toksinai yra atsakingi už tokias ligas kaip toksinio šoko sindromas (TŠS), nuplikytos odos

sindromas, plaučių uždegimas ir kitos sunkios infekcijos. Dėl šio ryšio tarp toksinų ir ligų, kyla didelis poreikis geriau suprasti *S. aureus* patogenezę (Nour Ahmad-Mansour ir kt., 2021).

1) Poras formuojantys toksinai:

- Hemolizina

Sisteminė *S. aureus* infekcija gali išsivystyti tik tada, kai bakterijos pažeidžia apsauginį epitelio sluoksnį (pvz., odą ar gleivines). Todėl *S. aureus* ne tik pasinaudoja esamais pažeidimais – ji taip pat aktyviai ardo epitelio vientisumą. Vienas iš svarbiausių veiksnių šiame procese yra α -toksinas. Jis veikia dviem pagrindiniais būdais ir abu priklauso nuo ADAM10 receptoriaus. Pirmu atveju α -toksinas prisijungęs prie ADAM10 susijungia su kitomis tokiomis pačiomis molekulėmis sudarydamas heptamerinę struktūrą. Ši struktūra sukuria poras įvairių ląstelių membranose ir taip jas pažeidžia. Antras mechanizmas: α -toksinas ardo epitelinius ir endotelinius barjerus, suardydamas ląstelių sukibimo jungtis ir pažeisdamas ląstelės vidinę struktūrą – citoskeletą. Toksinas suaktyvina baltymą ADAM10, kuris suskaido E-kadheriną – molekulę, atsakingą už ląstelių sukibimą tarpusavyje. Kai E-kadherinas yra suskaidomas, ląstelės nebesilaiko viena kitos, suyra ląstelių jungtys, o tai pažeidžia ląstelių vientisumą ir leidžia bakterijoms lengviau prasiskverbti į audinius. α -toksinas yra vienas pagrindinių virulentiškumo veiksnių, dažniausiai randamas patogeniniuose MRSA kamienuose. Be α -toksino *S. aureus* kamienai gali gaminti ir kitus hemolizinus: β , γ ir δ – toksinus (Monique R Bennett ir kt., 2020; Nour Ahmad-Mansour ir kt., 2021).

- Dvikomponenčiai leukotoksinai

Tai poras formuojantys, leukocitus naikinantys toksinai sudaryti iš dviejų skirtingų baltymų komponentų, kurie klasifikuojami kaip F ir S. Iki šiol iš žmogaus infekcijų metu išskirtų *S. aureus* kamienų buvo nustatyti keturi dvikomponenčiai leukotoksinai (1 lentelė):

- Pantono Valentino leukocidinas (PVL)
- γ - hemolizinas
- Leukotoksinas ED
- Leukotoksinas AB

PVL – tai poras formuojantis stiprus egzotoksinas, kurį sudaro du sinergiškai veikiantys baltymai LukS-PV ir LukF-PV. Žinoma, kad PVL glaudžiai susijęs su visuomenėje įgytais MRSA, ypač tais, kurie sukelia plaučių uždegimą arba odos bei minkštųjų audinių infekcijas. Šis ryšys su virulentiškais kamienais leidžia manyti, kad PVL gali sukelti mirtinas infekcijas net sveikiems žmonėms (Khawar Hussain ir kt., 2022).

PVL toksinas labiausiai pažeidžia žmogaus imuninės sistemos ląsteles, ypač granulocitus. PVL ardo žmogaus neutrofilų plazminę membraną, skatina reaktyviųjų deguonies formų išsiskyrimą, IL-8 gamybą, lizocimo bei histamino sekreciją. Didelės PVL koncentracijos plaučiuose sukelia neutrofilų žūtį, dėl ko atsiranda uždegimas, alveolių pažeidimas, edema, hemoraginė nekrozė ir net

mirtis. PVL gamybą lemia *lukS-PV* ir *lukF-PV* genai, kurie pernešami bakteriofagų (Nienke W. M. de Jong ir kt., 2019).

1 lentelė. *S. aureus* dvikomponenčiai leukotoksinai ir jų taikiniai (Francis Alonzo III ir kt., 2014)

Leukotoksinas	S komponentas	F komponentas	Toksinų taikiniai
PVL	LukS-PV	LukF-PV	Leukocitai ir neutrofilai
LukAB	LukA	LukB	Žmogaus monocitai, dendritinės ląstelės, neutrofilai ir leukocitai
LukED	LukE	LukD	Triušių kraujo ląstelės ir leukocitai, žmogaus neutrofilai, pelių fagocitai
γ-hemolizinas	HlgA, HlgC	HlgB	Žmogaus eritrocitai, neutrofilai, žmogaus ir triušių leukocitai

- Fenolyje tirpūs modulinai (PSM)

Jie skirstomi į kelias grupes (PSM α , PSM β ir δ -toksiną), kurios skiriasi savo struktūra ir krūviu. PSM molekulės prisitvirtina prie citoplazminės membranos nespecifiškai, jiems nereikia sąveikos su receptoriumi, ir taip suardo membraną. Be to, PSM molekulės linkusios jungtis į oligomeras ir formuoti poras. Manoma, kad PSM susiję su stafilokoko gebėjimu sukelti invazines infekcijas – tai lemia jų gebėjimas ardyti žmogaus neutrofilus ir skatinti uždegiminį atsaką. PSM taip pat padeda formuoti bioplėveles (Nour Ahmad-Mansour ir kt., 2021).

2) Eksfoliaciniai toksinai (ET):

Eksfoliaciniai toksinai (epidermoliziniai toksinai), kuriuos koduoja *eta* ir *etb* genai, yra labai specifinės serino proteazės, išskiriamos *S. aureus*. Pagrindiniai šiuo metu žinomi ET yra ETA, ETB, ETC ir ETD. ETA ir ETB dažniausiai susiję su žmogaus odos pažeidimais (Abayeneh Girma, 2024; John Scully ir kt., 2024). Šie toksinai sukelia keratinocitų jungčių ir ląstelių adhezijos pažeidimus epidermyje. Jie atpažįsta ir ardo desmogleiną-1 – jungiamąjį baltymą, kuris palaiko odos ląstelių ryšius, todėl epidermis atsiskiria. Tai lemia pūslelių susidarymą, odos lupimąsi ir erozijas. Visa tai sukelia stafilokokinį nuplikytos odos sindromą. Dažniausiai ši liga pasireiškia kūdikiams ir vaikams, nes jų imuninė sistema dar nesubrendusi, o inkstai silpnai šalina toksinus (Nour Ahmad-Mansour ir kt., 2021; Monique R. Bennett ir kt., 2020).

3) Superantigenai (SAg):

Nuo superantigenų (SAg) atradimo prieš daugiau nei 30 metų tapo aišku, kad tai svarbūs virulentiškumo veiksniai. *S. aureus* superantigenai sutrikdo šeimininko įgytą imunitetą skatindami

ypač didelį T ląstelių aktyvumą. SAg jungiasi prie II klasės MHC molekulių ir prie T ląstelių receptorių, dėl ko vienu metu suaktyvinama labai daug T ląstelių. Nekontroliuojama T ląstelių aktyvacija ir per didelis uždegiminių citokinų išsiskyrimas (pvz., IL-2, IFN- γ , TNF), sukuria reiškinį, vadinamą „citokinų audra“ (John Scully ir kt., 2024; Stephen W. Tuffs ir kt., 2018).

Stafilokokų SAg yra siejami su sunkiomis ligomis, įskaitant gyvybei pavojingas būkles, tokias kaip TŠS, pneumonija ir endokarditas. Sunkios *S. aureus* sukeltos pneumonijos atvejais SAg per daug suaktyvina imuninę sistemą, pažeidžia plaučių epitelį ir slopina neutrofilų aktyvaciją, sukeldami sunkų uždegimą. SAg gali taip pat prisidėti prie infekcinio endokardito vystymosi. Manoma, kad SAg ekspresija kraujyje gali sukelti uždegimą, kuris pažeidžia vožtuvus ir sukelia kapiliarų pralaidumą, o tai sumažina kraujo tekėjimą (John Scully ir kt., 2024; Stephen W. Tuffs ir kt., 2018).

Priklausomai nuo literatūros šaltinio ir klasifikavimo, iki šiol yra aprašyta apie 30 skirtingų *S. aureus* superantigenų. *S. aureus* superantigenų šeimai priklauso (John Scully ir kt., 2024; Goran Abdurrahman ir kt., 2020):

- toksinio šoko sindromo toksinas (TŠST),
- enterotoksinai (SEA–SEE, SEG–SEI, SER–SET)
- į enterotoksinus panašūs baltymai (SEIJ–SEIQ, SEIU–SEIZ).

Enterotoksinai A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) ir E (SEE) – tai klasikiniai *S. aureus* enterotoksinai, kurie priskiriami supernatigenams ir dažniausiai siejami su apsinuodijimų maistu protrūkiais. Šie toksinai, ypač SEA, sąlygoja stafilokokų sukeltą intoksikaciją. Tai išoriniai baltymai, atsparūs karščiui, šalčiui ir proteolitiniais fermentams. Toksinų veikimo mechanizmas pagrįstas jų sąveika su žarnynu. Enterotoksinai išlieka aktyvūs skrandyje, atsparūs skrandžio fermentams, patenka į žarnyną ir ten jie trikdo epitelinių ląstelių membranų vientisumą, didina žarnyno pralaidumą ir sukelia įvairias imuninės sistemos reakcijas. Nors tikslus veikimo mechanizmas dar nėra iki galo aiškus, manoma, kad jie skatina histamino išsiskyrimą iš žarnyno putliųjų ląstelių, o tai gali lemti pykinimą ir vėmimą. Visi enterotoksinai, kaip ir įprasta superantigenams, skatina uždegiminių citokinų gamybą ir sukelia stiprų uždegiminį atsaką. Sisteminės *S. aureus* sukeltos infekcijos dėl apsinuodijimo maistu yra labai retos (Mirian Yuliza Rubio Cieza ir kt., 2024; Diana Oliveira ir kt., 2018). Kol kas nėra aišku, ar ilgalaikis *S. aureus* buvimas žarnyne gali sukelti rimtesnes žarnyno ar net viso organizmo ligas. Tačiau tikėtina, kad žarnynas veikia kaip bakterijų „rezervuaras“, iš kurio *S. aureus* gali patekti į kitas kūno vietas ir sukelti infekcijas (Mirian Yuliza Rubio Cieza ir kt., 2024). Be superantigeninio veikimo, naujausi tyrimai rodo, kad enterotoksinai turi antiangiogeninį poveikį. SEC slopina kraujagyslių atsišakojimų formavimąsi ir angiogenezės tarpininko ekspresiją, taip prisidedant prie bakterijos sukulto endokardito (Kyle J. Kinney ir kt., 2022).

Vienas stipriausių *S. aureus* superantigenų – TŠST, sukelia toksinio šoko sindromą (TŠS) žmonėms. TŠS – tai reta, gyvybei pavojinga, toksinų sukelta infekcinė būklė, kuri greitai sukelia

sunkų šoką, daugybinį organų nepakankamumo sindromą ir gali baigtis mirtimi. TŠST skatina TNF- α , IL-1 ir IL-2 gamybą, taip sukeldamas pernelyg didelį uždegiminį atsaką. Tai gali pažeisti kraujagysles ir sukelti audinių pažeidimus. TŠST taip pat gali pereiti per gleivines (pvz., odą ar gleivinę), dėl ko atsiranda viso kūno reakcijos. TŠS gali sukelti labai žemą kraujospūdį (šoką), o tai savo ruožtu gali sukelti organų nepakankamumą ir net mirtį. Ši liga anksčiau dažnai ištikdavo moteris menstruacijų metu dėl netinkamų tamponų naudojimo, kai bakterijos sparčiai dauginosi makštyje (John Scully ir kt., 2024).

1.1.5. Ekstraląsteliniai fermentai

S. aureus yra itin virulentiškas patogenas, kurio gebėjimą sukelti įvairias infekcijas taip pat lemia platus ekstraląstelių fermentų arsenalas (Kayan Tam ir kt., 2021).

S. aureus lipazė (SAL) priklauso glicerolio esterų hidrolazių šeimai ir yra svarbus šios bakterijos virulentiškumo veiksnys. Visų pirma, SAL dalyvauja hidrolizuojant lipidus, o tai leidžia bakterijai kolonizuoti ir išgyventi riebalinėse kūno vietose, ypač ant odos. Tyrimai rodo, kad SAL reikšmingai silpnina odos barjerinę funkciją, skatina *S. aureus* kolonizaciją, ypač sergant atopiniu dermatitu. Be to, ši lipazė inaktyvuoja šeimininko bakteriocidinius lipidus, trukdo granulocitų funkcijai bei padidina bakterijos atsparumą šeimininko imuninės sistemos poveikiui. SAL aktyvumas taip pat yra susijęs su ląstelių nekroze, kas dar labiau išryškina jos vaidmenį infekcijų vystymesi ir patogenezėje. Be viso to, įrodyta, jog *S. aureus* lipazė dalyvauja bioplėvelių formavime (Gordon Y C Cheung ir kt., 2021).

Be lipazių, *S. aureus* gamina keturias patogenezei svarbias ekstraląstelines proteazes: serino proteazę, cisteino proteazę, metaloproteazę ir stafilopainą. Stafilokokų proteazių veikimo mechanizmas priklauso nuo jų cheminės struktūros ir aktyvaus centro pobūdžio, tačiau visos jos skaido šeimininko baltymus, tokius kaip elastinas, fibrinogenas ir komplemento sistemos komponentai. Šių baltymų skaidymas sutrikdo audinių vientisumą, slopina imuninių ląstelių aktyvaciją ir leidžia *S. aureus* išgyventi bei plisti organizme (Giampiero Pietrocola ir kt., 2017).

S. aureus želatinazė – tai svarbus bakterijų fermentas, skaidantis želatiną – baltymą, gaunamą iš kolageno. Šis skaidymo procesas aprūpina bakteriją amino rūgštimis, reikalingomis augimui ir išgyvenimui. Be to, želatinazė prisideda prie bakterijų gebėjimo plisti ir įsiskverbti į audinius, todėl laikoma vienu iš svarbių virulentiškumo veiksnių.

Be šių minėtų fermentų, *S. aureus* taip pat gamina ir kitus – koagulazę, kuri aktyvuoja kraujo krešėjimą ir suformuoja fibrino apsaugą nuo imuninės sistemos; nukleazę, kuri skaido šeimininko DNR ir padeda išvengti neutrofilų, hialuronidazę, ardančią jungiamąjį audinį ir skatinančią bakterijos plitimą bei stafilokinazę, kuri tirpdo fibrino krešulius ir palengvina migraciją audiniais. Visų šių fermentų koordinuotas veikimas leidžia *S. aureus* veiksmingai prisitaikyti, išvengti imuninės

sistemos atsako ir sukelti ūmias bei lėtines infekcijas įvairiuose organizmo vietose (Kayan Tam ir kt., 2021).

1.1.6. *S. aureus* sideroforai

S. aureus geležies pasisavinimui naudoja sideroforus – mažas molekules, turinčias didelį afinitetą geležiai, kurios yra būtinos bakterijų augimui ir virulentiškumui. *S. aureus* gamina du pagrindinius sideroforus – stafiloferiną A ir stafiloferiną B, kurie padeda bakterijai įveikti geležies trūkumą šeimininko organizme. Šie sideroforai yra išskiriami į ekstraląstelinę aplinką, o vėliau per specifinius receptorius transportuojami atgal į ląstelę, leidžiant bakterijai klestėti geležies stokojančiose sąlygose. Tiek stafiloferinas A, tiek stafiloferinas B yra sintetinami nuo neribosominių peptidų sintetazės nepriklausomu keliu ir priklauso karboksilatinių sideroforų šeimai. Genai, atsakingi už šių sideroforų biosintezę ir jų pernašą į ląstelę, yra reguliuojami Fur baltymo, todėl jų raiška būna didžiausia geležies trūkumo sąlygomis (Ghassan Ghssein ir kt., 2022; Warinda Prommachote ir kt., 2025).

1.2. *S. aureus* atsparumas antibiotikams

1.2.1. MRSA epidemiologija

S. aureus sukeltų infekcijų gydymas yra sudėtingas dėl vis dažniau pasitaikančio antibiotikų atsparumo, ypač dėl atsparumo meticilinui. Meticilinui atspari *S. aureus* bakterijos forma priklauso ESKAPE grupei (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Enterobacter* rūšys) – svarbiausių infekcijas sukeliančių bakterijų grupei, kuri pasižymi daugelio vaistų atsparumu (Abiye Tigabu ir kt., 2021). MRSA dažnai aptinkamas ligoninėse ir yra laikomas vienu iš dažniausiai pasitaikančių oportunistinių patogenų. *S. aureus* sukeltos infekcijos yra viena dažniausių hospitalinių mirčių priežastis, o jo antimikrobinis atsparumas (AAM) yra viena didžiausių grėsmių visuomenės sveikatai ir vienas didžiausių iššūkių visame pasaulyje (Assefa Asnakew Abebe ir kt. 2023; Naghavi Mohsen ir kt., 2024;).

Naujausi duomenys rodo, kad 2021 m. 4,71 mln. mirčių buvo susijusios su bakteriniu AAM (AAM buvo vienas iš veiksnių, prisidėjusių prie paciento mirties, tačiau nebūtinai pagrindinė jos priežastis), įskaitant 1,14 mln. mirčių, kurias tiesiogiai lėmė AAM. AAM sąlygotos mirtingumo tendencijos per pastaruosius 31 metus labai pakito priklausomai nuo amžiaus grupės ir geografinės vietovės. Nuo 1990 iki 2021 m. mirtingumas nuo AAM tarp vaikų iki 5 metų sumažėjo daugiau kaip 50 proc., tačiau tarp vyresnių nei 70 metų suaugusiųjų išaugo daugiau kaip 80 proc.. Tiek mirčių, susijusių su AAM, tiek tiesiogiai priskiriamų AAM, skaičius labiausiai išaugo dėl MRSA: nuo 261

000 susijusių mirčių ir 57 200 priskiriamų mirčių 1990 m., iki 550 000 susijusių mirčių ir 130 000 priskiriamų mirčių 2021 m. (Naghavi Mohsen ir kt., 2024). Lietuvoje 2020 m. atsparumui antimikrobinėms medžiagoms priskirtinų mirčių skaičius 100 000 žmonių buvo didesnis nei Europos Sąjungos vidurkis (European Centre for Disease Prevention and Control, 2024).

Be mirčių ir neįgalumo, antimikrobinis atsparumas sukelia ir didelius ekonominius nuostolius. 2020 m. duomenimis, su AAM susijusios Europos sveikatos priežiūros sistemų išlaidos siekė 1,1 mlrd. eurų per metus. Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms turi didelį poveikį pasauliniam bendrajam vidaus produktui (BVP) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2024). Pasaulio bankas prognozuoja, kad dėl AAM iki 2050 m. papildomos sveikatos priežiūros išlaidos gali siekti 1 trilijoną Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) dolerių, o BVP nuostoliai 2030 m. gali sudaryti nuo 1 iki 3,4 trilijono JAV dolerių per metus (Naghavi Mohsen ir kt., 2024).

Nors antibiotikų naudojimas gydant bakterijų sukeltas infekcijas yra neišvengiamas, ilgainiui neatsakingas, netinkamas ir dažnai perteklinis jų vartojimas lemia bakterijų atsparumo vaistams vystymąsi (Bandar Ali Alghamdi ir kt., 2023). Dar 1928 m. A. Flemingas pastebėjo, jog grybas *Penicillium notatum* gamina antibiotiką peniciliną, kuris slopina *S. aureus* augimą. Po 15 m., 1943 m. penicilinas buvo pradėtas taikyti stafilokokinių infekcijų gydymui klinikinėje praktikoje, reikšmingai pagerindamas infekcijų kontrolę ir sumažindamas mirtingumą. Tačiau atsparumas meticilinui buvo aptiktas dar prieš vaisto patvirtinimą - 1942 m., o nuo 1944 m. tokie kamieniai pradėjo plisti ne tik ligoninėse, bet ir visuomenėje. Bandant kovoti su atsparumu penicilinui, 1959 m. buvo pristatytas meticilinas (Ayliffe GA, 1997). Jis turi didelę, steriškai apkrautą šoninę grupę. Ši šoninė grupė apsaugo β -laktaminį žiedą nuo penicilinazės, todėl sumažėja meticilino afinitetas stafilokokų β -laktamazėms. Tačiau bakterijos rado kitą būdą kovoti su meticilinu - *S. aureus* atsparumas meticilinui, skirtingai nei atsparumas penicilinui, yra susijęs ne su vaisto inaktyvacija (β -laktamo žiedo hidrolize), o su vaisto taikinio modifikavimu – bakterijos pradėjo gaminti naują peniciliną surišančią baltymą 2a (PBP2a), kuris neprisijungia meticilino (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022).

Pirmieji MRSA kamieniai pastebėti jau 1960–1961 m. ir buvo atsparūs visiems tuo metu gydymui naudotiems β -laktaminiams antibiotikams. Tik 2010 m. buvo pristatyti du nauji cefalosporinai – ceftobiprolis ir ceftarolinas – veiksmingi prieš MRSA. Tačiau netrukus atsirado ir šiems vaistams atsparių bakterijų. Nors atsparumas, susijęs su β -laktamazių gamyba, yra laikomas siauro spektro – nes šie fermentai inaktyvuoja tik tam tikrus penicilinus – atsparumas, susiformavęs dėl PBP2a baltymo ekspresijos, yra plataus spektro. Taip yra todėl, kad visų tipų β -laktaminiai antibiotikai – įskaitant penicilinus, cefalosporinus ir karbapenemus – tampa neveiksmingi prieš bakterijas, kurios gamina PBP2a. Dėl to tokios bakterijos įgyja atsparumą visai β -laktamų grupei.

S. aureus turi gebėjimą išvystyti atsparumą įvairiems antibiotikams, ne tik β -laktaminiams antibiotikams. Atsparumo vystymasis ir jo vėlesnis plitimas įvyksta dėl horizontalaus genų perdavimo. MRSA įgyja papildomų atsparumo genų plazmidėse, transpozonuose ar kitose genetinėse struktūrose. Toks genų perdavimas leidžia atsirasti naujoms, antibiotikams atsparioms kamienams. Šis selektyvumas ypač dažnai stebimas ligoninėse, kur pacientų gydymui dažnai skiriama daug įvairių antibiotikų. Tačiau neišvengiamai ligoninėse atsirandantys atsparūs kamienai išplinta ir visuomenėje.

Daugelį metų MRSA buvo tapatinami išimtinai su hospitalinėmis infekcijomis, t.y. ligoninėje įgytomis (LI-MRSA). Tačiau paskutinį XX a. dešimtmetį atsirado MRSA kamienai, sukėlę infekcijas ne ligoninėse gydomiems pacientams, tai visuomenėje įgytas MRSA (VI-MRSA). Šie kamienai dažniau turėjo PVL toksiną koduojantį geną, susijusį su sunkesnėmis odos infekcijomis ir pneumonija, įprastai buvo atsparios tik β -laktamams, tačiau jautresnės kitiems antibiotikams. Tuo tarpu LI-MRSA paprastai pasižymėjo platesniu atsparumo spektru – jos dažnai buvo atsparios ne tik β -laktamams, bet ir daugeliui kitų antibiotikų grupių, įskaitant makrolidus, fluorochinolonus ir aminoglikozidus (Nicholas Tsouklidis ir kt., 2020).

1.2.2. β -laktaminių antibiotikų veikimo mechanizmas

β -laktaminiai antibiotikai taikosi į tam tikrus fermentus – transpeptidazes, transglikozilazes ir karboksipeptidazes, kurie dalyvauja peptidoglikano sintezėje. Peptidoglikanas, dar vadinamas mureinu, yra esminis bakterijų ląstelės sienelės komponentas, suteikiantis jai mechaninį stabilumą. Struktūriškai peptidoglikanas sudarytas iš glikano grandinių, kurias sudaro N-acetilgliukozamino (GlcNAc) ir N-acetilmuramo rūgšties (MurNAc) disacharidų subvienetai. MurNAc dalis yra sujungta su pentapeptidų arba tetrapeptidų grandinėmis (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022; Harshad Lade ir kt., 2023; Bandar Ali Alghamdi ir kt., 2023).

β -laktaminių antibiotikų inaktyvuojami baltymai dar vadinami peniciliną surišančiais baltymais (PBP). *S. aureus* paprastai turi keturis endogeninius peniciliną surišančius baltymus (PBP): PBP1, PBP2, PBP3 ir PBP4, o papildomas, įgytas PBP2a randamas MRSA kamienuose. Visi keturi endogeniniai PBP lokalizuojasi prie citoplazminės membranos, kur vyksta peptidoglikano sintezė. Kiekvienas iš šių PBP turi transpeptidazės aktyvumą, o PBP2 papildomai turi ir unikalų katalizinį domeną su transglikozilazės aktyvumu (Harshad Lade ir kt., 2023).

S. aureus PBP1 (tik su transpeptidazės aktyvumu) ir PBP2 (turintis tiek transglikozilazės, tiek transpeptidazės aktyvumą) yra būtini peptidoglikano sintezei. PBP3, turintis tik transpeptidazės aktyvumą, nėra būtinas – jo praradimas neturi įtakos bakterijos augimui ar išgyvenimui. PBP4, taip pat turintis tik transpeptidazės aktyvumą, yra reikalingas stipriai sujungto (kryžminio) peptidoglikano sintezei, kuris suteikia sieniei papildomo tvirtumo (Harshad Lade ir kt., 2023).

Kadangi PBP aktyvumas yra būtinas bakterijų išgyvenimui, jie yra patrauklūs antibiotikų, ypač β -laktaminių, taikiniai. Konkretūs PBP inaktyvacijos procesai lemia bakterijų žūtį. Prisijungdami prie PBP, kurie yra atsakingi už GlcNAc ir MurNAc kryžminį sujungimą, β -laktaminiai antibiotikai sutrikdo bakterijų ląstelės sienelės formavimąsi. β -laktaminiai antibiotikai slopina paskutinį peptidoglikano sintezės etapą – jie acilina transpeptidazę, kuri dalyvauja peptidų kryžminiame sujungime, formuojant peptidoglikano tinklą. Šis prisijungimas sutrikdo galutinį transpeptidazės procesą: įvyksta β -laktamo ciklinės amidinės jungties suardymas ir PBP acilinimas. Be tvirto peptidoglikano sluoksnio bakterijų ląstelių sienelės tampa silpnos ir nesugeba išlaikyti savo citoplazminio turinio. Sustabdydami ląstelės sienelės formavimąsi, β -laktaminiai antibiotikai slopina bakterijų augimą ir dauginimąsi, galiausiai sukeldami jų žūtį (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022; Harshad Lade ir kt., 2023; Zhuru Hou ir kt., 2023).

S. aureus atsparumas β -laktaminiams antibiotikams grindžiamas dviem pagrindiniais mechanizmais:

- taikinio pakitimas - naujo, papildomo PBP2a sintezė
- antibiotiko inaktyvavimas - β -laktamazių sintezė (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022).

2 lentelė. β -laktaminių antibiotikų atsparumą lemiančios determinantės (Harshad Lade ir kt., 2023)

β-laktaminiai antibiotikai	atradimo/ patvirtinimo metai	Atsparumo atsiradimo metai	Atsparumo determinantė / koduojamas baltymas
Penicilinas	1928/1943	1942	<i>blaZ</i> / <i>BlaZ</i> (β -laktamazė hidrolizuoja peptido jungtį β -laktamo žiede)
Meticilinas	1959	1960	<i>mecA</i> /PBP2a (PBP2a turi mažą afinitetą meticilinui)
Oksacilinas	1960/1971	nežinoma	<i>mecA</i> /PBP2a;
Cefoksitinas	1974/1978	nežinoma	<i>mecA</i> /PBP2a
Cefazolinas	1970/1973	1970	<i>mecA</i> /PBP2a
Ceftarolinas	2003/2010	2013	<i>mecA</i> /PBP2a; mutacijos <i>mecA</i> , <i>pbp2</i> , <i>pbp4</i> , <i>clpX</i> , <i>gdpP</i>

2 lentelės tęsinys. β -laktaminių antibiotikų atsparumą lemiančios determinantės (Harshad Lade ir kt., 2023)

β -laktaminiai antibiotikai	atradimo/ patvirtinimo metai	Atsparumo atsiradimo metai	Atsparumo determinantė / koduojamas baltymas
Ceftobiprolis	1998/2013	2008	<i>mecA</i> /PBP2a; mutacijos <i>mecA</i> , <i>pbp2</i> , <i>pbp4</i> , <i>clpX</i> , <i>gdpP</i>

1.2.3. β -laktamazės

Norėdamas neutralizuoti nepalankų β -laktaminių antibiotikų poveikį, MRSA gamina β -laktamazę (BlaZ) – fermentą, kuris skaido β -laktaminius antibiotikus ir naikina jų antibakterinį aktyvumą. Stafilokokų atveju atsparumo mechanizmas, pagrįstas β -laktamazių (penicilinazių) sinteze, yra labai dažnas. BlaZ veikia periplazminėje erdvėje, todėl antibiotikas yra neutralizuojamas dar prieš jam prisijungiant prie PBP. Šį fermentą koduoja *blaZ* genas, kuris paprastai randamas *blaI-blaR1-blaZ* operone. *blaZ* geno koduojamas BlaZ priklauso A tipo serino β -laktamazėms (Bandar Ali Alghamdi ir kt., 2023). BlaZ pasižymi dideliu hidroliziniu aktyvumu prieš pirmosios kartos penicilinus, bet silpnu aktyvumu prieš antrosios kartos penicilinus (pvz., meticiliną) ir pirmosios kartos cefalosporinus (pvz., cefazoliną). BlaZ fermentas hidrolizuoja keturių narių β -laktamo žiedo amidinę ryšį dviejų etapų acilinimo–deacilinimo reakcijų cikle, taip apsaugodamas PBP baltymus. Šie fermentai turi siaurą substratų spektrą, nes jų aktyvioji vieta yra pritaikyta atpažinti ir suskaidyti tik tam tikros struktūros β -laktaminius antibiotikus. Jie efektyviai hidrolizuoja vadinamuosius β -laktamazei jautrius penicilinus, tokius kaip penicilinas ir aminopenicilinas. Tačiau jie neveikia visų penicilinų – meticilinas yra specialiai sukurtas taip, kad β -laktamazė negalėtų jų veiksmingai atpažinti ar pasiekti dėl erdvinės struktūros pokyčių (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022).

Stafilokokinės BlaZ pagal serotipą ir substratų specifiškumą skirstomos į keturis tipus: A–D. A tipo serino BlaZ yra dažniausiai aptinkamos *S. aureus* kamienuose. Kiti tipai skiriasi savo gebėjimu hidrolizuoti skirtingus substratus, įskaitant kai kuriuos cefalosporinus. Pavyzdžiui: A ir D tipo β -laktamazės efektyviau hidrolizuoja cefazoliną ir nitrocefina, o B ir C tipo β -laktamazės yra efektyvesnės prieš cefalotiną. *blaZ* geną reguliuoja du genai: antirepresorius (*blaR*) ir represorius (*blaI*). Genai, koduojantys BlaZ, jo represorių BlaI ir membranoje įsitvirtinusį sensorių-perdaviklį BlaR1, yra išsidėstę kartu – tiek plazmidėje, tiek bakterijos chromosomoje. *blaZ* raiška nėra pastovi, ji aktyvuojama, kai ląstelė yra paveikiama β -laktaminiais antibiotikais. Jei β -laktaminių antibiotikų nėra, BlaI represorius slopina *blaZ-blaR1-blaI* operono transkripciją, taip neleidžiant gaminti BlaZ. Antibiotikui esant aplinkoje, BlaR1 prisijungia prie jo. Šis prisijungimas aktyvuoja BlaR1 cinko

metaloproteazės domeną, kuris suardo BlaI baltymą. Tai leidžia vyksti *blaZ* geno transkripcijai ir BlaZ gamybai (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022; Harshad Lade ir kt., 2023; Zhuru Hou ir kt., 2023).

1.2.4. Peniciliną surišančio baltymo 2a (PBP2a) sintezė

Svarbus MRSA atsparumo antibiotikams mechanizmas yra priklausomas nuo *mecA* geno. Skirtingai nei atsparumas penicilinui, atsparumas meticilinui nėra susijęs su vaisto inaktyvacija, t. y. β -laktaminio žiedo hidrolize. Vietoj to, jis kyla dėl vaisto taikinio modifikacijos. MRSA įgijo chromosomos kasetėje *mec* (SCC*mec*) lokalizuotą *mecA* geną. *mecA* genas koduoja pakitusį peniciliną surišantį baltymą (PBP2a), turintį žemą afinitetą β -laktaminiams antibiotikams, ir reguliacinius genus *mecR1* ir *mecI*. *mecA* genas gali būti horizontalaus genų perdavimo būdu pernešamas į įvairias kitas *S. aureus* rūšis. *mecA* geno pirmtakas yra *mecA1* genas, plačiai paplitęs *Staphylococcus sciuri* rūšyje (Zhuru Hou ir kt., 2023).

PBP2a – tai naujas peniciliną surišantis baltymas, turintis sumažintą afinitetą β -laktaminiams antibiotikams, kuris MRSA bakterijose pakeičia įprastą PBP, atsakingą už peptidoglikano kryžminį sujungimą. Šis baltymas leidžia bakterijai tęsti ląstelės sienelės sintezę net tada, kai kiti peniciliną surišantys baltymai yra slopinami β -laktaminiais antibiotikais (Menna-Allah W. Shalaby ir kt., 2020). PBP2a sintezę reguliuoja MecI represorius ir transmembraninis sensoriaus baltymas MecR1. Kai β -laktaminiai antibiotikai nėra prisijungę prie MecR1, MecI prisijungia prie *mec* operono promotoriaus ir slopina *mecA* geno raišką. Kai β -laktaminiai antibiotikai yra aplinkoje, jie prisijungia prie MecR1, MecR1 suardo MecI represorių, taip sutrikdydamas jo jungimąsi su *mecA* promotoriumi ir leidžiant jo ekspresiją - PBP2a sintezę. Šis peniciliną surišantis baltymas išlaiko transpeptidazės aktyvumą, kaip ir įprastas PBP2 baltymas *S. aureus*, tačiau skiriasi tuo, kad turi mažą afinitetą daugeliui β -laktaminių antibiotikų. Todėl ląstelių sienelės sintezė tęsiasi nepaisant β -laktaminių antibiotikų koncentracijų, taip išvengiant ląstelių mirties ir lizės. Šis MecI–MecR1 reguliacinis mechanizmas yra gana panašus į klasikinę *blaI–blaR1* sistemą, kuri reguliuoja penicilinazių sintezę (Beata Mlynarczyk-Bonikowska ir kt., 2022; Harshad Lade ir kt., 2023; Zhuru Hou ir kt., 2023).

MRSA paprastai įgyja atsparumą per *mecA* geną, koduojantį PBP2a, kuris leidžia išvengti β -laktaminių antibiotikų poveikio. Tačiau 2011 m. Jungtinėse Karalystėse ir Danijoje pirmą kartą buvo aptiktas naujas atsparumo meticilinui genas – *mecC*. Šis genas DNR lygmenyje rodo apie 70 proc. homologiškumą su klasikiniu *mecA* genu. Šis genas lokalizuotas SCC*mec* XI kasetėje ir koduoja PBP2c, kuris – kaip ir PBP2a – suteikia bakterijoms atsparumą β -laktaminiams antibiotikams (Zhuru Hou ir kt., 2023).

Skirtingai nei klasikinis *mecA*, *mecC* pasižymi keliais reikšmingais bruožais. *mecC*-MRSA yra atsparūs visiems β -laktamams: penicilinams, cefalosporinams, karbapenemams, tačiau dažnai

pasižymi žemesniu atsparumo lygiu, nei *mecA*-MRSA. PBP2c turi keturis kartus didesnę afinitetą oksacilinui nei PBP2a. Ankstesni tyrimai apie *mecC* parodė, kad minimalios slopinamosios koncentracijos oksacilinui svyruoja nuo 0,75 iki 32 µg/mL, o cefoksitinui – nuo 4 iki 64 µg/mL. Todėl kai kuriais atvejais *mecC*-MRSA fenotipiškai gali atrodyti kaip jautrios meticilinui, nors molekuliniam lygmenyje yra atsparios (Gavin K Paterson ir kt., 2014).

Nors dauguma *mecC*-MRSA infekcijų aptinkamos tarp galvijų, tokie sukėlėjai buvo identifikuoti ir klinikiniuose žmonių izoliatuose. Iki šiol dauguma *mecC*-MRSA sukeltų infekcijų žmonėms buvo užfiksuotos Europoje. Šių izoliatų galimas poveikis klinikinėje praktikoje kol kas nėra aiškus. Nors *mecC*-MRSA infekcijos tarp žmonių yra labai retos, yra aprašyti sunkūs ir net mirtini žmonių infekcijų atvejai, kuriuos sukėlė *mecC* turintys MRSA kamienai (Carmen Lozano ir kt., 2020).

1.2.5. PBP2a mutacijos

Literatūroje yra aprašyti atvejai, kai taškinės mutacijos PBP2a struktūroje padidina atsparumą kai kuriems β-laktaminiams antibiotikams. Tai dar vienas β-laktaminių antibiotikų atsparumo mechanizmo būdas, ypač kalbant apie MRSA. Mutacijos aktyviajame centre arba šalia jo gali sumažinti antibiotiko prisijungimo galimybes, keisti baltymo konformaciją, padidinti jo stabilumą ar aktyvumą. Tokios mutacijos gali apsunkinti gydymą, ypač kai naudojami naujesni β-laktamai, kaip ceftarolinas ar ceftobiprolis, kurie laikomi paskutinės eilės vaistais. Ceftarolinas yra pirmasis naujos kartos cefalosporinų klasės narys, patvirtintas naudoti JAV. Viso genomo sekoskaita atskleidė dvi mutacijas, sukeliančias aminorūgščių pokyčius, kurios buvo būdingos tik ceftarolino prisijungimo vietai PBP2a baltymo transpeptidazės regione atspariuose izoliatuose. Tolimesni tyrimai patvirtino, kad šie pokyčiai tiesiogiai sukėlė atsparumą ceftarolinui. Taigi, buvo nustatytas molekulinis mechanizmas, sukeliantis didelį atsparumą ceftarolinui (Harshad Lade ir kt., 2023).

1.3. MRSA bioplėvelių formavimo faktoriai

1.3.1. Bendra MRSA bioplėvelių charakteristika

Pirmą kartą bioplėvelės buvo pastebėtos XVII amžiuje Antonie van Leeuwenhoek, kuris aprašė „mikroorganizmus“, linkusius telktis į spiečius tiek ant negyvų, tiek ant gyvų paviršių ir kurie yra atsparūs intensyviai valymui (H C Slavkin, 1997). Šiandien bioplėvelė apibrėžiama kaip sudėtinga mikroorganizmų bendruomenė ar struktūra, prisitvirtinusi prie paviršiaus ir apsupta apsauginiu sluoksniu – ekstraląsteline polimerine matrica, kurią daugiausia sudaro polisacharidai, baltymai ir ekstraląstelinė DNR. Bioplėvelių formavimosi procesas yra natūrali prokariotų gyvavimo ciklo dalis. Bioplėvelės padidina mikroorganizmų išgyvenimo tikimybę, nes bioplėvelėse esančios bakterijos yra

geriau apsaugotos nuo nepalankių fizinių ir cheminių aplinkos veiksnių, o aplink jas esanti ekstrapolisacharidinė matrica padeda išlaikyti drėgmę bei kaupti maistines medžiagas. Be to, bioplėvelėje pagerėja maisto medžiagų pernaša tarp bakterijų, o artimas jų kontaktas skatina horizontalią genų pernašą. Visos šios bioplėvelių savybės leidžia bakterijoms įsitvirtinti naujose ekologinėse nišose (Ashlesha Kaushik ir kt., 2024).

Bioplėvelės formavimuisi būtinas tinkamas substratas, paviršius bei aplinka. Pavyzdžiui, kolonizacija ir vėlesnis bioplėvelių susidarymas dažniau vyksta ant šiurkščių paviršių dėl didesnio paviršiaus ploto ir palankių fizinių-cheminių savybių. Tai reiškia, kad implantai, medicinos prietaisai gali būti labai tinkama vieta bioplėvelių formavimuisi. Taip pat sukibimo greitis ir mastas gali kisti priklausomai nuo cheminių dangų sudėties (Qi Peng ir kt., 2023; Rafik Aniba ir kt., 2024; Thamiris Santana Machado ir kt., 2020).

Stafilokokai, įskaitant MRSA, žinomi kaip pagrindiniai su bioplėvelėmis susijusių infekcijų sukėlėjai. *S. aureus* bioplėvelės yra sudarytos iš vandens ir organinių medžiagų. Bakterijų kolonijos ir ekstraląstelinė matrica sudaro reikšmingą bioplėvelės dalį. Bioplėvelių formavimas yra esminis *S. aureus* bakterijų virulentiškumo veiksnys, lemiantis užsitęsusias ir pasikartojančias su medicinos prietaisais susijusias infekcijas. MRSA bioplėvelės gali susidaryti ant įvairių medicininių paviršių, tokių kaip kateteriai, kontaktiniai lęšiai, mechaniniai širdies vožtuvai ir protezai. Mikroorganizmai bioplėvelėse geba ilgam laikui pereiti į ramybės būseną, trunkančią nuo savaičių iki metų. Ši latentinė būklė gali išlikti tol, kol atsiranda palankios sąlygos plisti ir išprovokuoti lokalizuotą arba sisteminę infekciją (Ashlesha Kaushik ir kt., 2024).

Bioplėvelių formavimas yra svarbi savybė, kuri skatina *S. aureus* atsparumo vaistams vystymąsi. Pasikartojančios infekcijos po gydymo antibiotikais dažnai yra siejamos su bioplėvelių buvimu. Dėl savo struktūros ir polimerinės matricos bioplėvelės sukuria unikalų apsauginį mechanizmą, leidžiantį bakterijoms išvengti antibiotikų poveikio, nes apribojamas antibiotikų difuzijos procesas. Bioplėvelėse gyvenančios bakterijos pasižymi iki 1000-1500 kartų didesniu atsparumu antibiotikams bei kitiems biologiniams ir cheminiams veiksniams, palyginti su laisvai plaukiojančiomis (planktoninėmis) bakterijomis (Muhammad Idrees ir kt., 2021).

Be stipraus apsauginio sluoksnio, bioplėvelės taip pat sukuria palankias sąlygas horizontaliam genų perdavimui - tai yra pagrindinis veiksnys, prisidedantis prie pasaulinės antimikrobinio atsparumo krizės. Kadangi bioplėvelėje bakterijos yra nejudrios ir labai arti viena kitos, tai sudaro puikias sąlygas intensyviems ląstelių tarpusavio kontaktams, todėl bioplėvelė yra ideali terpė genų mainams ir antimikrobinio atsparumo genų perdavimui įvairiais būdais. Nors intensyvus ir agresyvus gydymas antibiotikais gali pristabdyti bioplėvelių plitimą, jis paprastai nesugeba visiškai sunaikinti visos bioplėvelės bendruomenės. Siekiant pagerinti gydymą, šiuo metu tiriama daugybė molekulių

kaip papildomos terapijos priemonės šalia antibiotikų, tai sudaro aktyvią ir sparčiai besiplečiančią mokslinių tyrimų sritį (Muhammad Idrees ir kt., 2021).

1.3.2. Bioplėvelių formavimosi molekuliniai mechanizmai

Bioplėvelės formavimosi procesas apima kelis svarbius etapus. Pirmasis – tai laisvai plaukiojančių mikroorganizmų prisitvirtinimas prie paviršiaus. Po prisitvirtinimo vyksta nedidelės kolonijos (mikrokolonijos) formavimasis, susidaro sudėtinga trimatė struktūra (bakterijų bendruomenė). Maža bioplėvelė vystosi, bręsta ir galiausiai dalis jos atsiskiria (1 pav.) (Qi Peng ir kt., 2022).

1) Prisitvirtinimo fazė:

Pradinė bakterijos prisitvirtinimo fazė prie gyvų (pvz., kraujagyslių, kaulų ar sąnarių) arba negyvų (pvz., protezų, kateterių) paviršių vyksta naudojant - MSCRAMM grupės baltymus, kurie atpažįsta adhezinės matricos molekules. Pagrindiniai *S. aureus* adheziją sąlygojantys MSCRAMM baltymai yra sukibimo faktorius A (ClfA) ir sukibimo faktorius B (ClfB). Šie baltymai inicijuoja prisitvirtinimą, jungdamiesi prie fibrinogeno. Kiti baltymai priskiriami MSCRAMM baltymų grupei, tokie kaip kolageno adhezinės bei α -enolazė, kuri padeda jungtis prie plazminogeno, taip pat dalyvauja pradiniam prisitvirtinime. Šis *S. aureus* gebėjimas jungtis prie įvairių biotinių paviršių padeda MRSA kolonizuoti pažeistas šeimininko vietas (Xiying Wu ir kt., 2024; Qi Peng ir kt., 2022).

2) Brendimas/proliferacija:

Po sėkmingo prisitvirtinimo pradeda formuotis bioplėvelės matrica, jungianti bakterijų ląsteles. Pagrindinis MRSA ekstraląstelinės matricos komponentas yra PIA, sudarytas iš dalinai deacetilintų N-acetilgliukozamino monomerų. PIA atlieka svarbų vaidmenį stafilokokų bioplėvelių formavime bei apsaugo bakterijas nuo šeimininko imuninės sistemos bei fagocitų. PIA sintezė priklauso nuo *icaADBC* operono, kurio ekspresijos produktai yra IcaA, IcaD, IcaB ir IcaC (tarpląstelinės adhezijos baltymai) (Patrice François ir kt., 2023). IcaA yra transmembraninė N-acetilgliukoziltransferazė, kuri kartu su IcaD sintetina daugiau kaip 20 likučių turinčius N-acetilgliukozamino oligomerus. Tuomet IcaC perkelia šiuos polisacharidus į ląstelės paviršių. Galiausiai IcaB deacetilina poli-N-acetilgliukozamino molekules, o tai svarbu, kad šie polimerai geriau prisitvirtintų prie išorinio ląstelės paviršiaus ir skatintų bioplėvelės formavimąsi. *icaADBC* genų buvimas koreliuoja su padidėjusiu patogeniškumu. Prieš *ica* operoną yra reguliacinis *icaR* genas. *icaR* veikia kaip neigiamas PIA gamybos reguliatorius, t.y. *icaR* slopina PIA sintezę ir bioplėvelių formavimą (Khadijeh Bammeshin ir kt., 2024).

MRSA taip pat gali formuoti bioplėveles nepriklausomai nuo *icaADBC* sistemos. Bioplėvelės formavimą gali lemti taip pat kiti paviršiaus baltymai, tokie kaip Bap, SasG, SasC, fibronektiną

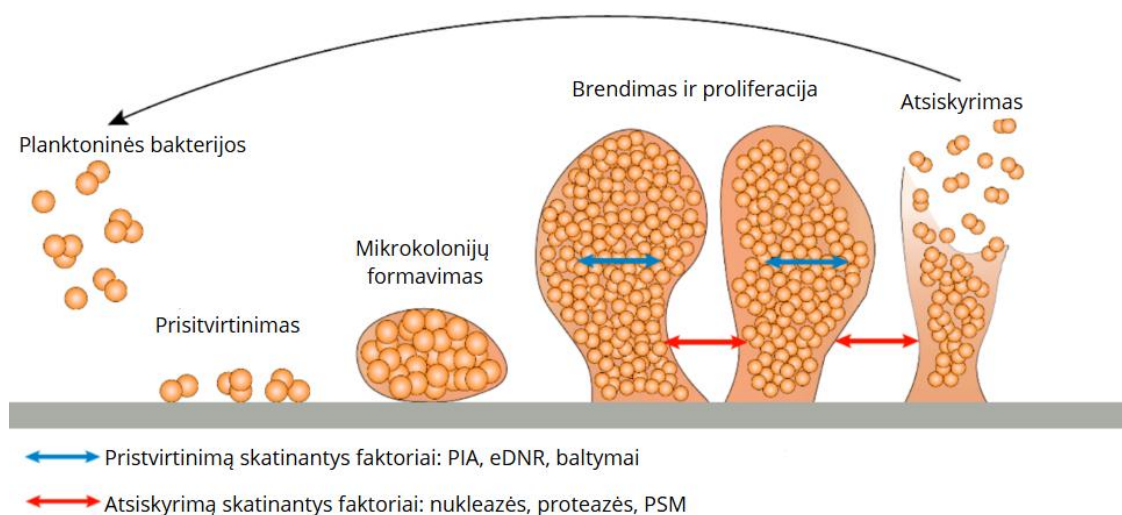
surišantys baltymai bei baltymas A (Ahmed Azzam ir kt., 2024; Eduardo Hernández-Cuellar ir kt., 2023).

Kiti svarbūs MRSA bioplėvelės komponentai: ekstraląstelinės DNR, teicho rūgštys ir amiloidinės struktūras formuojantys baltymai. Bioplėvelės pasižymi išskirtine trimate struktūra su kanalais, kurie susidaro dėl paviršiaus aktyviųjų molekulių poveikio bei fermentų, tokių kaip proteazės.

3) Atsiskyrimas:

Kai bioplėvelė visiškai subręsta, ji pradeda skaidytis, išlaisvindama prisitvirtinusias ląsteles, kurios gali vėl kolonizuoti tą pačią (pirminę) ar naują (antrinę) vietą. Subrendusios bioplėvelės atsiskyrimas gali vykti aktyviai arba pasyviai. Aktyvaus atsiskyrimo metu bakterijos išskiria fermentus, ypač fosfodiesterazes, kurios skaido ekstraląstelinę matricą ir palengvina mikrokolonijų paplitimą. Šis reiškinys suaktyvėja pasikeitus aplinkos sąlygoms. Pasyvus atsiskyrimas vyksta veikiant mechaniniams veiksniams. Atsiskyrusios planktoninės bakterijos gali laisvai kolonizuoti naujas vietas ir pradėti procesą iš naujo.

Aktyvus bioplėvelės atsiskyrimas priklauso nuo įvairių veiksnių: maistinių medžiagų ir deguonies prieinamumo, toksinų egzistavimo bei kitų streso faktorių. Šį procesą reguliuoja *agr* operonas, koduojantis AgrA, AgrB, AgrC ir AgrD baltymus, kurie taip pat reguliuoja kvorumo jutimą (ang. *quorum sensing*) (ląstelių tarpusavio komunikaciją) (Abayeneh Girma, 2024). Agr sistemos reguliuojamas bioplėvelės atsiskyrimas vyksta išskiriant įvairius proteazės fermentus ir fenolyje tirpius modulinius (PSM). Šios proteazės ir PSM veikia kaip paviršiaus aktyviosios medžiagos (surfaktantai), ardančios bioplėvelę. Agr sistema aktyvuojama atpažinus autoinduktorius (signalą perduodančius peptidus). Šie peptidai, susidarę AgrD ekspresijos metu, kaupiasi ir suaktyvina sistemos genus. Autoindukuojantis peptidas laikomas potencialiu taikiniu terapinėms intervencijoms siekiant sutrikdyti bioplėvelių formavimąsi (Qi Peng ir kt., 2022).



1 pav. *S. aureus* bioplėvelės formavimosi etapai. Pirmame bioplėvelės formavimosi etape planktoninės (laisvai plaukiojančios) bakterijos prisitvirtina prie paviršiaus naudodamos paviršiuje esančius baltymus. Po prisitvirtinimo ląstelės palaipsniui telkiasi į grupes ir pradeda gaminti ekstraląstelinę matricą, taip formuodamos mikrokolonijas. Ląstelės dalijantis, palaipsniui susiformuoja brandi bioplėvelė. Galiausiai, atsiskyrimo etape, tokie fermentai kaip proteazės, nukleazės ir fenolyje tirpūs modulinai (PSM) skatina bioplėvelės atsiskyrimą, leidžiant bakterijoms atsiskirti nuo bioplėvelės, grįžti į planktoninę būseną ir kolonizuoti naujas ekologines nišas. PIA - tarpląstelinės adhezijos polisacharidas; eDNR – ekstraląstelinė DNR. (Qi Peng ir kt., 2023).

1.3.3 Su bioplėvelių formavimu susiję genai

MRSA atveju bioplėvelių formavimą daugiausia reguliuoja 10 genų: tarpląstelinės adhezijos (*icaA, B, C, D ir R*) genai, klampumo faktorių (*clfA* ir *clfB*) genai, elastiną surišančio baltymo (*ebps*) genas, lamininą surišančio baltymo (*eno*) ir kolageną surišančio baltymo (*cna*) genai. Šie genai koduoja įvairius paviršiaus baltymus, kurie lemia *Staphylococcus aureus* prisitvirtinimą prie šeimininko, kolonizaciją, bioplėvelės formavimą ir bendrai virulentiškumą. *cna* genas koduoja kolageną surišančius baltymus, skatinančius paviršiaus adheziją, o *icaABCD* genai – ląstelių tarpusavio sukibimą. *clfA* ir *clfB* genai koduoja baltymus, jungiančius bakterijas prie šeimininko fibrinogeno, taip palengvindami kolonizaciją, bioplėvelės susidarymą ir virulentiškumą (Khadijeh Bamneshin ir kt., 2024; Muhammad Idrees ir kt., 2021;). *ebps* ir *eno* genai koduoja elastiną ir lamininą surišančius baltymus, skatinančius prisitvirtinimą prie šeimininko audinių ir bioplėvelės formavimąsi. Be visų šių pagrindinių su bioplėvelių formavimu susijusių genų yra dar keli papildomi genai, kurie nepriklausomai nuo *ica* operono gali lemti tarpląstelinę adheziją. Tai tokie paviršiaus baltymus koduojantys genai kaip *bap*, *sasG*, *sasC* (Qi Peng ir kt., 2022).

Bap yra paviršiaus baltymas, turintis LPXTG motyvą, kuris atsakingas už nepriklausomą nuo *ica* operono, t.y. nepriklausomą nuo ekstraląstelinę matricą sudarančio polisacharido (PIA), bioplėvelės formavimąsi MRSA. Bap, koduojamas *bap* geno, dalyvauja bakterijų prisitvirtinime prie negyvų paviršių, tarpląstelinėje adhezijoje ir bioplėvelės formavime. Apibendrinant, Bap atlieka

dvejopą funkciją: tarpininkauja bakterijų tarpusavio sąveikose bei bakterijų ir šeimininko sąveikoms. Vis dėlto molekuliniai mechanizmai, kuriais Bap atlieka šias funkcijas, ir konkrečios baltymo sritys, atsakingos už kiekvieną iš šių procesų, vis dar nėra ištirtos. Nuo Bap atradimo dauguma tyrimų buvo skirti ištirti, kaip šis baltymas skatina adheziją ir bioplėvelės vystymąsi. Nustatyta, Bap sukeltas bioplėvelės formavimasis vyksta reaguojant į aplinkos signalus (Sudhir K. Shukla ir kt., 2022; Jaione Valle ir kt., 2020).

3 lentelė. *Staphylococcus aureus* bioplėvelės formavime dalyvaujantys genai ir jų koduojami baltymai (Qi Peng ir kt., 2023)

Su bioplėvelių formavimų susiję genai	Koduojamas baltymas	Funkcija
<i>icaA</i>	N-acetilgliukozaminiltransferazė (IcaA)	Sintetina N-acetilgliukozamino oligomerus, svarbi PIA sintezei ir bioplėvelės formavimui
<i>icaB</i>	Deacetilazė (IcaB)	Deacetilina poli-N-acetilgliukozamino molekules, leidžia polimerui prisitvirtinti prie ląstelės paviršiaus, skatina bioplėvelės formavimąsi
<i>icaC</i>	Transferazė (IcaC)	Perkelia sintetintus polisacharidus į išorinį ląstelės paviršių
<i>icaD</i>	Baltymo IcaA kofaktorius (IcaD)	Sustiprina IcaA aktyvumą polisacharidų sintezėje
<i>icaR</i>	Neigiamas reguliatorius (IcaR)	Slopina <i>ica</i> operono veiklą ir PIA gamybą
<i>clfA, clfB</i>	Sukibimo faktorius A, B (ClfA, ClfB)	Jungiasi prie fibrinogeno, skatina šeimininko audinių kolonizaciją
<i>ebps</i>	Elastiną surišantis baltymas (EbpS)	Palengvina prisitvirtinimą prie elastino turinčių audinių

3 lentelės tęsinys. *Staphylococcus aureus* bioplėvelės formavime dalyvaujantys genai ir jų koduojami baltymai (Qi Peng ir kt., 2023)

Su bioplėvelių formavimu susiję genai	Koduojamas baltymas	Funkcija
<i>eno</i>	Lamininą surišantis baltymas (Eno)	Skatina prisitvirtinimą prie šeimininko laminino
<i>cna</i>	Kolageną surišantis baltymas (Cna)	Skatina prisitvirtinimą prie kolageno turinčių audinių
<i>bap</i>	Su bioplėvele susijęs baltymas (Bap)	Dalyvauja bakterijų prisitvirtinime prie negyvų paviršių, tarpląstelinėje adhezijoje ir bioplėvelės formavime.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Darbe naudotos medžiagos ir reagentai

Darbe naudotos medžiagos MRSA izoliatų auginimui:

- Komercinė Brain Heart Infusion (BHI) Agar terpė

Darbe naudoti reagentai ir medžiagos polimerazės grandininiai reakcijai (PGR) ir elektroforezei:

- DNR fragmentų ilgio standartas GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific);
- DNR fragmentų ilgio standartas GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific);
- 50x TAE buferis (Thermo Fisher Scientific)
- DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific);
- Etidžio bromidas (ROTH, Vokietija);
- Agarozė (Lonza, Šveicarija)
- Genominė DNR (išskirta iš *S. aureus* izoliatų)
- Darbe tirtų genų (*nuc*, *mecA*, *mecC*, *lukS/F-PV*, *tsst*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *eta*, *etb*, *spa*, *fnbA*, *fnbB*, *bap*, *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *cna*, *sea*, *sec*, *seb*, *sed*, *see*) pradmenys (NorthSpeed Biotech, Lietuva) (4 lentelė).
- Distiliuotas dejonizuotas vanduo (dH₂O) (Thermo Fisher Scientific)

Darbe naudoti reagentai ir medžiagos kiekybiniam MRSA bioplėvelių aktyvumo nustatymui:

- Skysta terpė Luria-Bertani (LB) (Roth, Vokietija) su 0.5 proc. gliukozės
- Etanolis 96 proc. (Honeywell, Vokietija)
- 1 proc. kristalo violeto tirpalas (Merck KGaA, Vokietija)
- Teigiamo kontrolė *S. aureus* ATCC 25923

Darbe naudotos terpės fenotipiniam MRSA virulentiškumo nustatymui:

- Komercinė Gelatin Agar (Roth, Vokietija) terpė
- Chrome azurol S (CAS) terpė sideroforų nustatymui gaminta pagal Loudon ir kt. (2011) ir Liu ir kt. (2024) aruošimui naudota: Mėlynas dažas (Chrome Azurol S (CAS) (AppliChem, Vokietija), geležies(III) chlorido heksahidratas (AppliChem, Vokietija, HDTMA (heksadeciltrimetilamonio bromidas) (Fisher Scientific, Vokietija), distiliuotas vanduo), Minimalios terpės 9 koncentratas (KH₂PO₄ (kalio divandenilio fosfatas) (AppliChem, Vokietija), natrio chloridas (AppliChem, Vokietija))), 20 proc. gliukozės (AppliChem, Vokietija) tirpalas, Kazamino rūgšties (MERCK, Vokietija) tirpalas, PIPES (AppliChem, Vokietija) buferis, Agaras (Agar-Agar) (Roth, Vokietija).

- Brain-Heart Broth (LABM, Jungtinė Karalystė) terpė su 1,5 proc. nugriebto pieno milteliais (Roth, Vokietija)
- Nutrient Agar (OXOID, Jungtinė Karalystė) terpė su 1 proc. tributirino (Fisher Scientific, Vokietija)

2.2. Darbe naudota įranga

- Stalinė centrifuga „Eppendorf“ (Vokietija)
- Elektroforezės aparatas „Sub-Cell GT“
- Transiluminatorius „Gel DocDNr (Minibis Pro)“
- Termostatas „Binder“ (Vokietija)
- II saugos klasės laminariniai boksai „Thermo Fisher Scientific, Scanlaf Mars“ (JAV, Danija)
- Optinio tankio matuoklis „Biochrom CO8000“ (Jungtinė Karalystė)
- Mikroplokštelių skaitytuvas „Thermo Fisher Scientific Varioskan Flash“ (JAV)
- Elektroninės svarstyklės
- Mikrobangų krosnelė (Samsung);

2.3. Darbe naudoti bakterijų izoliatai

Tyrimo buvo naudoti MRSA izoliatai gauti iš dviejų Vilniaus miesto ligoninių. MRSA izoliatai buvo išskirti iš hospitalizuotų pacientų klinikinių mėginių. *S. aureus* fenotipinį apibūdinimą ir atranką pagal atsparumą meticilinui atliko ligoninės personalas. Išskirtų klinikinių izoliatų atsparumas meticilinui buvo ištirtas taikant diskų difuzijos metodą.

2.4. Polimerazės grandininė reakcija (PGR) naudoti pradmenys

Darbe PGR naudoti oligonukleotidų pradmenys buvo pasirinkti remiantis literatūros šaltiniais. Informacija apie pradmenis pateikta 4-toje lentelėje.

4 lentelė. Darbe naudotų pradmenų sekos.

Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	PGR produkto dydis, bp	Literatūros šaltinis
<i>nuc – F</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT	278	Javed ir kt., 2023
<i>nuc – R</i>	AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC		
<i>mecA - F</i>	GTGGAAGTTAGATTGGGATCATA GC	544	Noguchi ir kt., 2006
<i>mecA - R</i>	GTCAACGATTGTGACACGATAGC		

4 lentelės tęsinys. Darbe naudotų pradmenų sekos.

Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	PGR produkto dydis, bp	Literatūros šaltinis
<i>mecC</i> – F	GCTCCTAATGCTAATGCA	304	Cuny ir kt., 2011
<i>mecC</i> – R	TAGCAATAATGACTACC		
<i>lukS/F-PV</i> - F	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGAC ATGATCCA	1930	Lina ir kt., 1999
<i>lukS/F-PV</i> - R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAA AAGC		
<i>tsst</i> – F	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350 (505, 731)	Bertelloni ir kt., 2015
<i>tsst</i> - R	TTTCCAATAACCACCCGT TT		
<i>icaA</i> – F	TCT CTT GCA GGA GCA ATC AA	188 (268, 879)	
<i>icaA</i> - R	TCA GGC ACT AAC ATC CAG CA		
<i>icaB</i> – F	TTGCCTGTAAGCACACTGGA	735	Aniba ir kt., 2024
<i>icaB</i> – R	GGAGTTCGGAGTGA CTGCTT		
<i>icaC</i> – F	CTTGGGTATTTCACGCATT	209	Mahmood ir kt., 2022
<i>icaC</i> – R	GCAATATCATGCCGACACCT		
<i>icaD</i> – F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198	Bertelloni ir kt., 2015
<i>icaD</i> – R	CGTGTTTTCAACATTTAATGC AA		
<i>icaR</i> – F	TTCCAGAAAATTCCTCAGGCG	735	Aniba ir kt., 2024
<i>icaR</i> – R	TCAGAGAAGGGGTATGACGG		
<i>eta</i> – F	ATATCAACGTGAGGGCTCTAGTA C	1155	Noguchi ir kt., 2006
<i>eta</i> – R	ATGCAGTCAGCTTCTTACTGCTA	604 (183)	
<i>etb</i> - F	CACACATTACGGATAATGCAAG		
<i>etb</i> – R	TCAACCGAATAGAGTGA ACTTAT CT		
<i>spa</i> – F	CAAGCACCAAAAGAGGAA	dydis varijuoja (polimorfizm as)	Bhati ir kt., 2016
<i>spa</i> – R	CACCAGGTTTAACGACAT		
<i>fnbA</i> – F	ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG	191	Aniba ir kt., 2024
<i>fnbA</i> – R	ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACC		
<i>fnbB</i> – F	ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG	197	
<i>fnbB</i> – R	ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG		
<i>bap</i> – F	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATT G	971	
<i>bap</i> – R	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCT GC		
<i>clfA</i> – F	CCGGATCCGTAGCTGCAGATGCA CC	1000	
<i>clfA</i> – R	GCTCTAGATCACTCATCAGGTTGT TCAGG		
<i>clfB</i> – F	AACTCCAGGGCCGCCGTTG	159	Mahmood ir kt., 2022
<i>clfB</i> – R	CCTGAGTCGCTGTCTGAGCCTGA G		
<i>ebps</i> – F	CAATCGATAGACACAAATTC	526	Atiyah ir kt., 2019
<i>ebps</i> – R	CAGTTACATCATCATGTTTA		

4 lentelės tęsinys. Darbe naudotų pradmenų sekos.

Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	PGR produkto dydis, bp	Literatūros šaltinis
<i>cna</i> – F	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA	192	Zmantar ir kt., 2008
<i>cna</i> – R	AGTGCCTTCCCAAACCTTTT		
<i>sea</i> – F	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	102 (445)	Javed ir kt., 2023
<i>sea</i> – R	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG		
<i>sec</i> – F	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATG G	451 (798, 862)	
<i>sec</i> – R	CACACTTTTAGAATCAACCG		
<i>seb</i> – F	ACATGATGCCTGCACCAGGAGA	406 (798, 399, 821)	
<i>seb</i> – R	AGGTTTGACGCAAATGATGCATG G		
<i>sed</i> – F	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAA TAATATG	492 (301)	
<i>sed</i> – R	CTGTATTTTTCCTCCGAGAGT		
<i>see</i> – F	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	209 (774)	
<i>see</i> – R	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC		

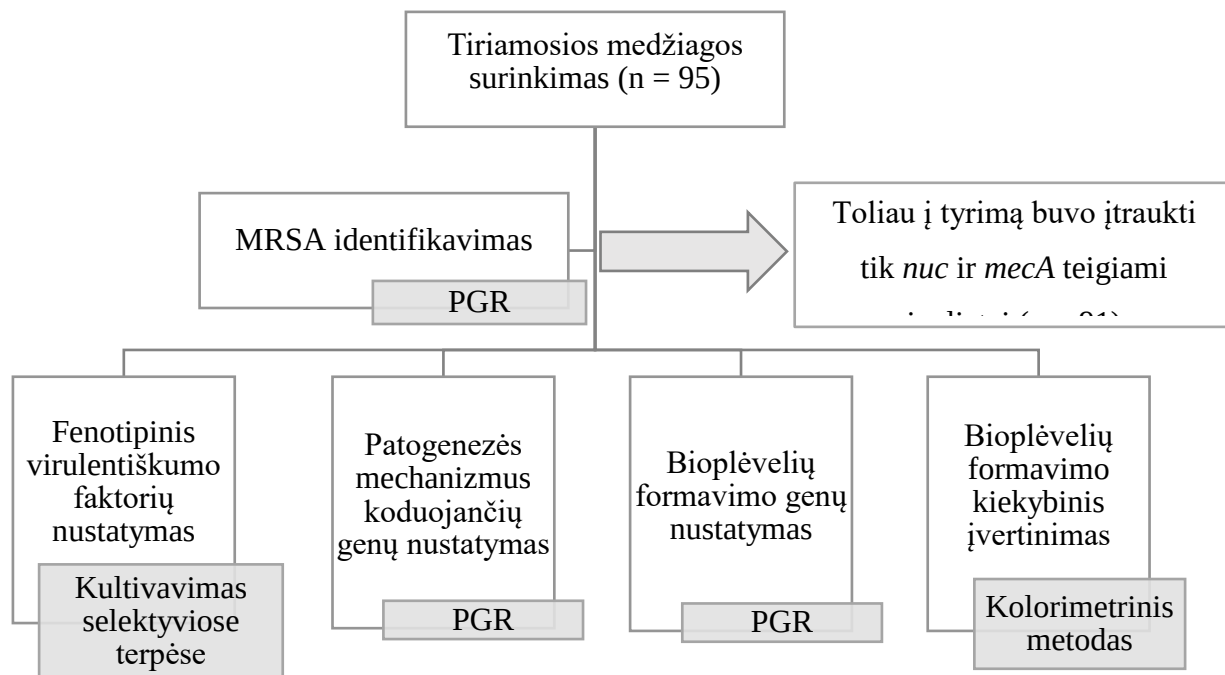
2.5. Bendra tyrimo eiga ir vykdymo etapai

Tyrimas atliktas 2024 m. sausio mėn. - 2025 m. gegužės mėn. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro (VU GMC) Biomokslų instituto Prokariotų molekulinės mikrobiologijos ir taksonomijos laboratorijoje ir Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto (VU MF) Biomedicinos mokslų institute bendradarbiaujant su VU MF mokslininkais.

Tyrimas buvo atliekamas keliais etapais. *S. aureus* kultivavimas, genominės DNR išskyrimas, fenotipinis virulentiškumo faktorių nustatymas ir bioplėvelių formavimo kiekybinis įvertinimas buvo vykdomi VU MF Biomedicinos mokslų institute, o genų nustatymas ir selektyvių terpių paruošimas atlikti VU GMC Biomokslų instituto Prokariotų molekulinės mikrobiologijos ir taksonomijos laboratorijoje.

Darbe naudoti klinikiniai izoliatai buvo renkami nuo 2024 m. sausio 1 d. iki 2024 m. lapkričio 30 d. iš dviejų Vilniaus miesto ligoninių. Iš viso per šį laikotarpį buvo surinkti 95 klinikiniai MRSA izoliatai. Visi surinkti klinikiniai izoliatai buvo saugomi Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų institute -70 °C temperatūroje.

Tyrimo eiga, vykdyti etapai ir naudoti metodai pavaizduoti bendroje tyrimo atlikimo schemoje 1 pav. Prieš kiekvieną tyrimo etapą bakterijos kultivuotos BHI agare aerobinėmis sąlygomis termostate 24 val. 35 ± 1 °C temperatūroje.



2 pav. Bendra tyrimo atlikimo schema.

2.6. MRSA identifikavimas

Iš ligoninių gauti fenotipiškai ir diskų difuzijos metodu patvirtinti MRSA izoliatai pakartotinai buvo identifikuoti molekuliniiais metodais nustatant *nuc* ir *mecA* genus. Genai nustatyti atliekant PGR. Genų nustatymui PGR metodu buvo išskirtas bakterijų DNR.

MRSA lizatų paruošimas:

- 1) -70 °C temperatūroje saugoti klinikiniai izoliatai buvo iššėti ir kultivuojami BHI agare (24 val., 35 ± 1 °C temperatūroje).
- 2) Į sterilius 1,5 ml Eppendorf mėgintuvėlius įpilta 500 µL sterilaus dejonizuoto vandens;
- 3) Plastikine 1 µL sterilia kilpele nukabintos vidutiniškai 3–4 bakterijų kolonijos, užaugusios neselektyvioje terpėje (BHI agare) ir suspenduotos paruoštuose Eppendorf mėgintuvėliuose su dejonizuotu vandeniu;
- 4) Mėgintuvėliai su bakterijų kultūra sumaišyti maišykle iki tolygaus bakterijų pasiskirstymo dejonizuotame vandenyje, kol nesimatė terpės elementų;
- 5) Mėgintuvėliai sustatyti į karščiui atsparų stovą;
- 6) Mėgintuvėliai su bakterijų kultūra buvo kaitinami 96 °C 10 min., o vėliau atvėsinti kambario temperatūroje;
- 7) Lizatai centrifuguoti 10 min., 10 000 aps./min. greičiu;

- 8) Po centrifugavimo į naujus sterilius Eppendorf mėgintuvėlius perpilta viršutinė skaidri lizato dalis (supernatantas), o mėgintuvėliuose likusios nuosėdos buvo tinkamai utilizuotos.
- 9) Mėgintuvėliai su paruoštais supernatantais buvo užšaldyti -20 °C temperatūroje ir taip laikyti iki tyrimo.

25 µL PGR reakcijos mišinį sudarė: DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), dejonizuotas vanduo, 1 µL kiekvieno pradmens ir 1 µL izoliato genominės DNR. PGR reakcijų sąlygos parinktos remiantis Javed ir kt. (2023) bei Noguchi ir kt. (2006) darbais ir nurodytos 5-toje lentelėje.

5 lentelė. PGR reakcijų etapai ir sąlygos

Genai	Pradinė denatūracija	Denatūracija	Pradmenų prisijungimas	Sintezė	Galutinė sintezė	Ciklų skaičius*
<i>nuc</i>	94 °C, 3 min.	94 °C, 90 sek.	55 °C, 2 min.	72 °C, 90 sek.	72 °C, 3 min.	30
<i>mecA</i>	95 °C, 3 min	95 °C, 30 sek.	58 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 3 min.	25

*Ciklų skaičius aktualus tik šiems etapams: denatūracija, pradmenų prisijungimas, sintezė.

PGR produktų aptikimas ir vizualizavimas atliktas horizontalios elektroforezės 1 proc. agarozės gelyje. Į gelio šulinėlius suleista 10 µl PGR produkto. Elektroforezė atlikta naudojant 120 V srovę elektroforezės aparate „Sub-Cell GT“ (BIO-RAD, JAV) 1,5 val. PGR amplifikuotas produktas vizualizuotas apšviečiant gelį 302 nm bangos ilgio ultravioletiniais spinduliais transiliumatoriuje „Gel DocDNR (Minibis Pro)“. Elektroforezės rezultatai buvo vertinami remiantis literatūros šaltiniuose nurodytais amplifikuotų produktų dydžiais, naudojant komercinius molekulinės masės žymenis (GeneRuler 100 bp ir 1 Kb Ladder).

2.7. Fenotipinis virulentiškumo faktorių nustatymas

1) Sideroforų gamybos įvertinimas:

Sideroforų gamybai vertinti buvo taikytas spalvinis Chrome Azurol S (CAS) testas, paruošiant specialią indikacinę terpę remiantis literatūroje pateiktomis metodikomis (Louden ir kt., 2011; Liu ir kt., 2024). Bakterijų kultūros buvo kultivuojamos CAS agaro terpėje ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje 24 valandas. Apie teigiamą sideroforų gamybą rodė geltonų aureolių susidarymas aplink kolonijas.

CAS agaro terpės paruošimui buvo reikalingi mėlynas dažas, minimalio terpės koncentratas ir kiti komponentai.

Mėlyno dažo (Blue Dye) paruošimui buvo parengti trys atskiri tirpalai:

- Tirpalas I: 0,06 g Chrome Azurol S (CAS) ištirpinta 50 mL dH₂O;
- Tirpalas II: 0,0027 g FeCl₃·6H₂O ištirpinta 10 mL dH₂O;

- Tirpalas III: 0,073 g HDTMA ištirpinta 40 mL dH₂O.

Tirpalas I buvo sumaišytas su 9 mL tirpalo II, tuomet į jį buvo lėtai supiltas tirpalas III. Mišinys nusidažė mėlynai ir buvo sterilizuotas autoklave bei laikytas plastikiniame butelyje iki naudojimo.

Minimalios terpės (MM9) ir kitų komponentų paruošimas:

- MM9 koncentratas: 15 g KH₂PO₄, 25 g NaCl ir 50 g NH₄Cl ištirpinti 500 mL dH₂O ir sterilizuoti autoklave.
- 20 proc. gliukozės tirpalas: 20 g gliukozės ištirpinta 100 mL dH₂O, autoklavuoti.
- Kazamino rūgšties tirpalas: 3 g casamino rūgšties ištirpinta 27 mL dH₂O, autoklavuota.

CAS agaro terpės paruošimas:

Į 375 mL dH₂O buvo įpilta 50 mL sterilizuoto MM9 koncentrato. Mišinio pH sureguliuotas iki 6,0, po to į lėtai maišomą tirpalą buvo įberta 16,12 g PIPES buferio. Pamažu pH pakeltas iki 6,8 (neviršijant šios ribos). Į mišinį buvo įberta 7,5 g agaro (nepilnai ištirpintas), kuris vėliau sterilizuotas autoklave. Po autoklavavimo, sustingusi terpė ištirpinta mikrobangų krosnelėje, atvėsinta iki ~50 °C, ir į ją įpilta 15 mL kazamino rūgšties tirpalo bei 5 mL 20 proc. gliukozės tirpalo. Galiausiai, lėtai maišant, buvo supilta 50 mL Blue Dye dažo palei indo sienelę. Paruošta terpė supilstyta į Petri lėkšteles

2) Proteazės aktyvumo įvertinimas:

Proteazės aktyvumas buvo įvertintas taikant kazeino hidrolizės testą, remiantis Gundogan ir kt. (2013) ir Hashem ir kt. (2021) metodikomis. Klinikiniai MRSA izoliatai buvo pasėti ant maistinės agaro (NA, Oxoid) terpės, papildytos 1,5 proc. nugriebto pieno milteliais. Lėkštelės inkubuotos 37 °C temperatūroje 24 val. Skaidrios zonos aplink kolonijas rodė teigiamą proteazės aktyvumą.

3) Želatinazės aktyvumo įvertinimas:

Želatinazės aktyvumas buvo nustatytas remiantis Chaudhari ir kt. (2022) ir Hashem ir kt. (2021) darbuose pateiktais metodais. Į agaro terpę su želatina (paruošta pagal gamintojo nurodymus, Roth, Vokietija) buvo pasėti klinikiniai MRSA izoliatai. Kultūros inkubuotos 37 °C temperatūroje 24 val. aerobinėje aplinkoje. Po inkubacijos lėkštelės 1 val. buvo laikytos 2–8 °C temperatūroje, o vėliau užlašintas 4,1 M amonio sulfato tirpalas. Skaidri zona aplink kolonijas rodė želatinos hidrolizę.

4) Lipazės aktyvumo įvertinimas

MRSA lipazės aktyvumas buvo įvertintas taikant tributirino agaro testą pagal Saising ir kt. (2012). Pagal gamintojo nurodymus buvo paruoštas maistinis agaras (NA, Oxoid), papildytas 1 proc. tributirino (Fisher Scientific, Vokietija), ir į jį pasėti klinikiniai MRSA izoliatai. Kultūros inkubuotos 37 °C temperatūroje 24 val. Skaidrių zonų susidarymas aplink kolonijas rodė teigiamą lipazės aktyvumą. Vertinimas atliktas remiantis MsangoSoko ir kt., (2022).

2.8. Virulentiškumo genų nustatymas

Patogenezės mechanizmus koduojančių genų ir su bioplėvelių formavimu susijusių genų nustatymas atliktas tik molekuliniiais metodais patvirtintuose MRSA klinikiniuose izoliatuose (t. y. izoliatai, kuriuose buvo nustatyti *nuc* ir *mecA* genai). Iš viso buvo nustatomi ir analizuoti 22 MRSA virulentiškumo genai: *lukS/F-PV*, *tsst*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *eta*, *etb*, *spa*, *fnbA*, *fnbB*, *bap*, *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *cna*, *sea*, *sec*, *seb*, *sed*, *see*. PGR reakcijų sąlygos parinktos remiantis literatūros šaltiniais. PGR reakcijų etapai ir sąlygos nurodyti 6-toje lentelėje.

6 lentelė. MRSA virulentiškumo genų PGR reakcijų etapai ir sąlygos

Genai	Pradinė denatūracija	Denatūracija	Pradmenų prisijungimas	Sintezė	Galutinė sintezė	Ciklų skaičius*
<i>lukS/F-PV</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 90 sek.	55 °C, 30 sek.	72 °C, 60 sek.	72 °C, 3 min.	30
<i>tsst</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 2 min.	55 °C, 2 min.	72 °C, 60 sek.	72 °C, 3 min.	29
<i>icaA</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 30 sek.	55,5 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 60 sek.	30
<i>icaB</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 30 sek.	55,5 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 60 sek.	30
<i>icaC</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 30 sek.	55,5 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 60 sek.	30
<i>icaD</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 30 sek.	55,5 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 60 sek.	30
<i>icaR</i>	95 °C, 1 min.	94 °C, 60 sek.	54 °C, 60 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 10 min.	35
<i>eta</i>	94 °C, 5 min	95 °C, 30 sek.	52 °C, 30 sek.	72 °C, 90 sek.	72 °C, 2 min.	25
<i>etb</i>	94 °C, 5 min	95 °C, 30 sek.	52 °C, 30 sek.	72 °C, 90 sek.	72 °C, 2 min.	25
<i>spa</i>	94 °C, 5 min	94 °C, 60 sek.	55 °C, 60 sek.	70 °C, 60 sek.	72 °C, 5 min.	34
<i>fnbA</i>	94 °C, 4 min.	94 °C, 45 sek.	58 °C, 40 sek.	72 °C, 40 sek.	72 °C, 5 min.	30
<i>fnbB</i>	94 °C, 4 min.	94 °C, 45 sek.	58 °C, 60 sek.	72 °C, 40 sek.	72 °C, 5 min.	30
<i>bap</i>	94 °C, 4 min.	94 °C, 45 sek.	58 °C, 40 sek.	72 °C, 40 sek.	72 °C, 5 min.	30
<i>clfA</i>	94 °C, 4 min.	94 °C, 45 sek.	58 °C, 60 sek.	72 °C, 40 sek.	72 °C, 5 min.	30
<i>clfB</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 30 sek.	55,5 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 1 min.	30
<i>ebpS</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 60 sek.	50 °C, 60 sek.	72 °C, 60 sek.	72 °C, 2 min.	30
<i>cna</i>	94 °C, 5 min.	94 °C, 30 sek.	55,5 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 1 min.	30

*Ciklų skaičius aktualus tik šiems etapams: denatūracija, pradmenų prisijungimas, sintezė.

6 lentelės tęsinys. MRSA virulentiškumo genų PGR reakcijų etapai ir sąlygos

Genai	Pradinė denatūracija	Denatūracija	Pradmenų prisijungimas	Sintezė	Galutinė sintezė	Ciklų skaičius*
<i>sea</i>	94 °C, 2 min.	94 °C, 25 sek.	54 °C, 2 min.	72 °C, 40 sek.	72 °C, 6 min.	30
<i>sec</i>	94 °C, 2 min.	94 °C, 25 sek.	54 °C, 2 min.	72 °C, 40 sek.	72 °C, 6 min.	30
<i>seb</i>	94 °C, 10 min.	94 °C, 5 min.	58 °C, 1 min.	72 °C, 1 min.	72 °C, 10 min.	35
<i>sed</i>	95 °C, 5 min.	95 °C, 30 sek.	55 °C, 30 sek.	72 °C, 60 sek.	72 °C, 10 min.	35
<i>see</i>	95 °C, 5 min.	94 °C, 60 sek.	50 °C, 1 min.	72 °C, 60 sek.	72 °C, 5 min.	30
<i>mecC</i>	95 °C, 2 min.	94 °C, 30 sek.	50 °C, 30 sek.	72 °C, 30 sek.	72 °C, 4 min.	30

*Ciklų skaičius aktualus tik šiems etapams: denatūracija, pradmenų prisijungimas, sintezė.

PGR mišinio sudėtis ir DNR produktų frakcionavimo gelyje procesas anksčiau aprašytas šiame darbe 2.6. *MRSA identifikavimas* skyriuje.

2.9. MRSA bioplėvelių formavimo kiekybinis įvertinimas

MRSA gebėjimas formuoti bioplėveles buvo įvertintas taikant kolorimetrinį metodą, pagrįstą kristalvioleto dažymu ir optinio tankio (OT) matavimu mikroplokštelių spektrofotometru. Tyrimas atliktas naudojant 96-ių šulinelių mikroplokšteles, remiantis Christensen ir kt. (1985), Adilson Oliveira ir kt., (2010) bei Ghazvinian ir kt. (2024) metodais.

MRSA klinikinių izoliatų bakterijų kultūros buvo kultivuojamos skystoje LB terpėje papildytoje 0,5 proc. gliukozės 2 ml tūrio mėgintuvėlyje 37 °C temperatūroje 24 val. aerobinėmis sąlygomis be maišymo. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį buvo įpilta 20 µL inkubuotų bakterijų kultūros bei pridėta 180 µL LB skystos terpės. Tyrimai atlikti tris kartus kiekvienam izoliatui. Kaip neigiamas kontrolinis ėminys naudota neinokuliuota LB skysta terpė su 0,5 proc. gliukozės, o kaip teigiamas kontrolinis kamienas – *S. aureus* ATCC 25923. Inkubacija mikroplokštelėse atlikta 37 °C temperatūroje 24 val. aerobinėmis sąlygomis be maišymo. Po 24 val. inkubacijos, plokštelių šulinelių turinys buvo išpiltas, o šulinėliai praskalauti tris kartus 200 µL distiliuotu vandeniu siekiant pašalinti planktonines ir silpnai prisitvirtinusias bakterijas. Mikroplokštelės buvo džiovinamos kambario temperatūroje, apverstos ant vienkartinio popierinio rankšluosčio, maždaug 1 valandą.

Šulinelių dugne susidariusi bioplėvelė buvo fiksuojama 96 proc. etanoliu (200 µL į kiekvieną šulinėlį) 5 minutėms. Po fiksacijos etanolis buvo išpiltas ir plokštelė buvo išdžiovinta ore. Užfiksuotos mikroplokštelių šlinelių dugne bioplėvelės dažytos 1 proc. kristalvioletiniu tirpalu 10 minučių. Perteklinis dažas buvo pašalintas tris kartus plaunant 200 µL distiliuotu vandeniu, o

plokštelės džiovintos 1 val. Bioplėvelėje susikaupęs kristalvioletinis dažas buvo ištirpintas kiekviename šulinėlyje įpilant po 200 μ L 96 proc. etanolio. Optinis tankis buvo matuojamas spektrofotometru 580 nm bangos ilgio diapazone (OT_{580}). Matavimai buvo atlikti tris kartus.

OT_{580} duomenys buvo analizuojami skaičiuojant kiekvieno mėginio ir neigiamos kontrolės vidurkius bei medianas pagal Stepanović S ir kt. (2000) aprašytą formulę. Gauti OT_{580} vidurkiai buvo naudojami kaip pagrindinis kriterijus bioplėvelės formavimo gebėjimui vertinti, kadangi vidurkis tiksliau atspindėjo rezultatų pasiskirstymą. Remiantis neigiamos kontrolės optinio tankio vidurkiu ir jo trijų standartinių nuokrypių verte (OTK_{580}), izoliatai buvo suskirstyti į keturias grupes pagal gebėjimą formuoti bioplėveles.

- Neformuojantys bioplėvelių: $OT_{580} \leq OTK_{580}$
- Silpnai bioplėveles formuojantys: $OTK_{580} < OT_{580} \leq 2 \times OTK_{580}$
- Vidutiniškai bioplėvelės formuojantys: $2 \times OTK_{580} < OT_{580} \leq 4 \times OTK_{580}$
- Stipriai bioplėveles formuojantys: $OT_{580} > 4 \times OTK_{580}$

2.10. Statistinė analizė

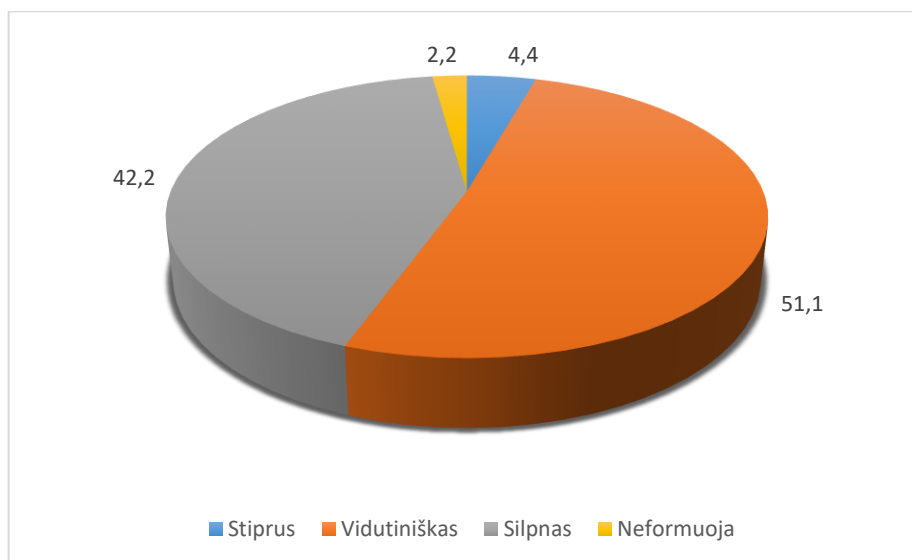
Statistinei duomenų analizei buvo naudotas programinis statistinių duomenų paketas R Commander 4.4.1. Kategoriniai duomenys apibūdinti dažniais – absoliučiais skaičiais ir procentais. Kokybinių duomenų skirtumų statistiniam reikšmingumui įvertinti taikytas Pirsono χ^2 kriterijus, o tais atvejais, kai bent vienas tikėtinas dažnis dažnių lentelėje buvo mažesnis nei 5, naudotas Fišerio tikslusis kriterijus. Koreliaciniams ryšiams tarp kintamųjų nustatyti buvo taikyta Pirsono koreliacijos analizė. Rezultatų skirtumas laikytas statistiškai reikšmingu, kai $p \leq 0,05$. Atliekant daugkartinius palyginimus, p reikšmės buvo koreguotos naudojant Holm'o metodą, siekiant sumažinti klaidingai teigiamų rezultatų tikimybę. Duomenų vizualizacija atlikta naudojant R Commander ir Microsoft Excel programas.

3. REZULTATAI

3.1. Tiriamų MRSA kamienų bendra charakteristika

Iš dviejų Vilniaus miesto ligoninių buvo gauti 95 klinikiniai MRSA izoliatai išskirti iš hospitalizuotų pacientų. Visuose tirtuose izoliatuose nustatytas *nuc* genas, todėl visi klinikiniai izoliatai buvo identifikuoti kaip *S. aureus*. Penki (5,26 proc.) klinikiniai izoliatai neturėjo atsparumą meticilinui koduojančio geno *mecA*. Visiems izoliatams papildomai buvo nustatomas alternatyvus atsparumą meticilinui koduojantis genas *mecC*, tačiau nei viename tirtame izoliate šis genas nebuvo aptiktas. Toliau analizuojami buvo tik *nuc* ir *mecA* teigiami izoliatai, identifikuoti kaip MRSA, taigi iš viso į tolimesnę analizę buvo įtraukti 90 klinikinų *S. aureus* izoliatai.

Apskaičiuota MRSA bioplėvelių vidutinė OT₅₈₀ reikšmė buvo $0,62 \pm 0,31$, OTK₅₈₀ reikšmė buvo 0,28. Remiantis šiomis vertėmis, beveik visi klinikiniai MRSA izoliatai formavo bioplėveles (97,8 proc). Pusė izoliatų bioplėveles formavo vidutiniškai (51,1 proc.), šiek tiek mažesnę dalis izoliatų bioplėveles formavo silpnai (42,2 proc.). Tik labai nedidelė dalis izoliatų buvo stipriai bioplėvelę formuojantys (4,4 proc.) ir vos 2,2 proc. visai neformavo bioplėvelių (3 pav.). Analizuojant tyrimo duomenis pagal bioplėvelių formavimo gebėjimą, stipriai formuojančių ir neformuojančių MRSA klinikinų izoliatų duomenys nebuvo įtraukti dėl per mažos izoliatų imties.



3 pav. Tirtų MRSA klinikinų izoliatų pasiskirstymas pagal gebėjimą formuoti bioplėveles (proc.).

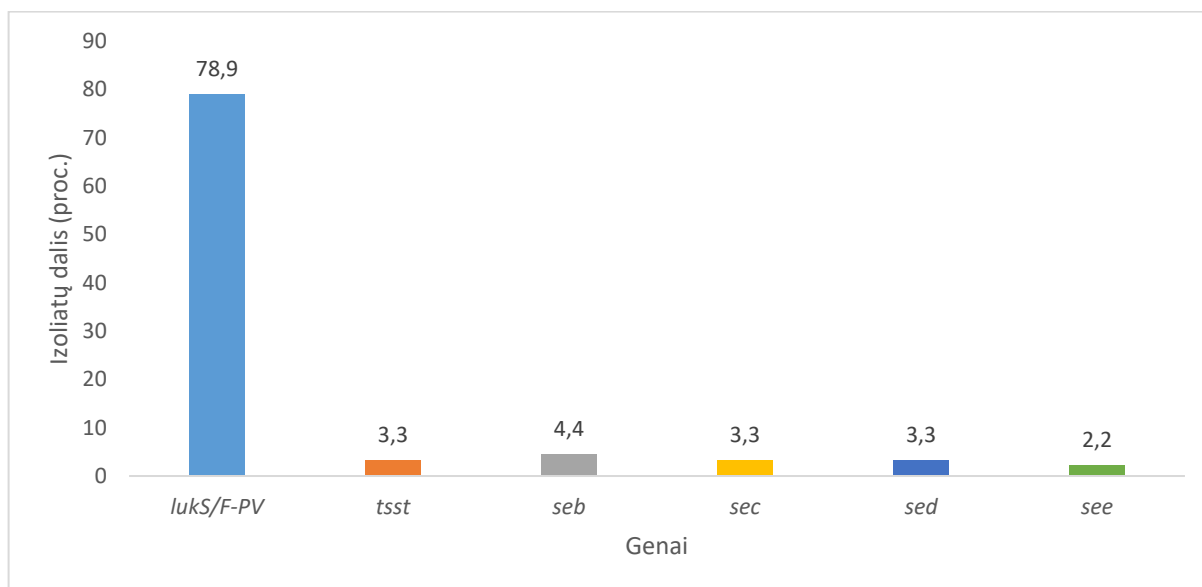
Duomenys apie pacientus, klinikinų infekcijų išraišką ir klinikinų ėminį kilmę nebuvo pateikti ligoninių ir šiame tyrime nebuvo analizuojami.

3.2. Genetinių patogenezės mechanizmų ir bioplėvelių formavimo faktorių paplitimas klinikiniuose MRSA izoliatuose

3.2.1. Patogenezės mechanizmus koduojančių genų paplitimas klinikiniuose MRSA izoliatuose

Tyrimo metu buvo ištirti 9 MRSA toksinus koduojantys genai: *lukS/F-PV*, *tsst*, *eta*, *etb*, *sea*, *seb*, *sed*, *see*.

Tyrimo duomenimis, dauguma MRSA klinikinių izolatų turėjo tik 1 iš 9 tirtų genų, kas sudarė vos 10,6 proc. visų tirtų patogenezės mechanizmus koduojančių genų. Mažas šių genų paplitimas rodė jų ribotą pasiskirstymą tirtuose mėginiuose. PVL toksiną koduojantis genas (*lukS/F-PV*) buvo labiausiai paplitęs tarp tirtų izolatų (78,9 proc.). Enterotoksinių genai (*seb*, *sec*, *sed*, *see*), kaip ir TŠS toksiną koduojantis genas (*tsst*), nustatyti tik pavieniais atvejais, jų paplitimas siekė nuo 2,2 proc. iki 4,4 proc (4 pav.). Eksfoliacinius toksinus koduojantys genai (*eta*, *etb*) bei enterotoksina koduojantis genas *sea* nebuvo aptikti nei viename izoliata.



4 pav. Patogenezės mechanizmus koduojančių genų paplitimas tirtuose MRSA klinikiniuose izoliatuose

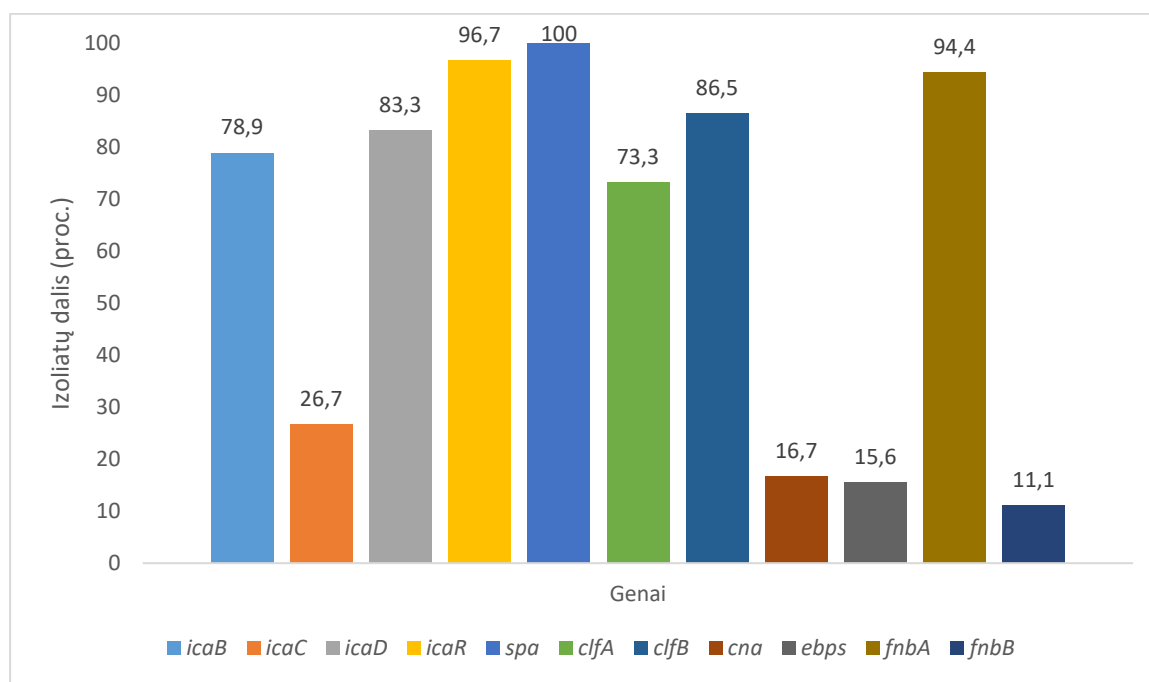
Nors 82,2 proc. tirtų izolatų turėjo bent vieną patogenezės mechanizmus koduojantį geną, genų kombinacijos nebuvo dažnos. Vienas izolatas (1,1 proc.) turėjo 3 genų kombinaciją (*lukS/F-PV*, *seb*, *sec*), kas dešimtas izolatas turėjo dviejų skirtingų genų kombinacijas, o visi likę izoliatai (71,1 proc.) turėjo vos po vieną toksiną koduojantį geną.

11,1 proc. tirtų izolatų turėjo bent vieną enterotoksina koduojantį geną: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*. Tačiau enterotoksinių kombinacijos irgi nebuvo dažnos. Tik du klinikiniai izoliatai turėjo daugiau negu 1 enterotoksina koduojantį geną.

3.2.2. Su bioplėvelių formavimu susijusių genų paplitimas

Tyrimo metu buvo įvertintas įvairių virulentiškumo genų, susijusių su bioplėvelių formavimu, paplitimas. Visi tirti genai priskirti šiai grupei buvo tiesiogiai arba netiesiogiai susiję su ekstraląsteline arba tarpląsteline adhezija. Iš viso buvo ištirta 13 skirtingų genų (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *spa*, *bap*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebps*, *fnbA*, *fnbB*), palengvinančių arba skatinančių MRSA adheziją ir bioplėvelių formavimą.

Pusės tirtų genų paplitimas izoliatuose siekė 73-100 proc. Nustatyta, kad dažniausias genas buvo *spa*, aptiktas visuose (100 proc.) klinikiniuose izoliatuose. Kiti dažnai nustatyti genai buvo *icaR* (96,7 proc.), *fnbA* (94,4 proc.), *clfB* (86,5 proc.), *icaD* (83,3 proc.) ir *icaB* (78,9 proc.) ir *clfA* (73,3 proc.). Keturių tirtų genų (*icaC*, *cna*, *ebps*, *fnbB*) paplitimas buvo mažesnis ir siekė 11-28 proc., o du genai (*bap*, *icaA*) nebuvo aptikti ne viename tirtame izoliate (5 pav.).



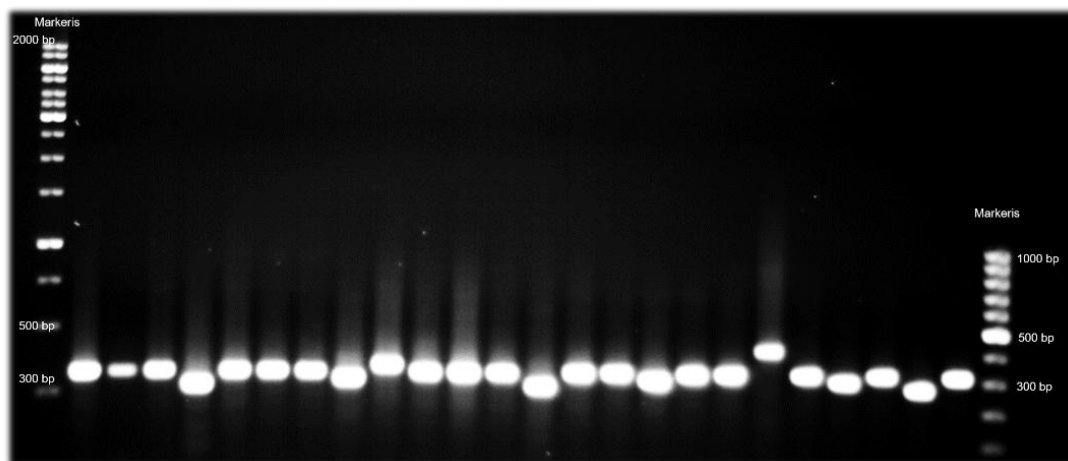
5 pav. Genų, koduojančių su bioplėvelės formavimu susijusius baltymus, paplitimas tirtuose MRSA klinikiniuose izoliatuose

Tolimesnei analizei šie genai buvo suskirstyti į dvi grupes:

- genai, koduojantys tarpląstelinės adhezijos baltymus (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR*, *bap*, *spa*)
- genai, koduojantys ekstraląstelinės adhezijos baltymus (*clfA*, *clfB*, *cna*, *ebps*, *fnbA*, *fnbB*)

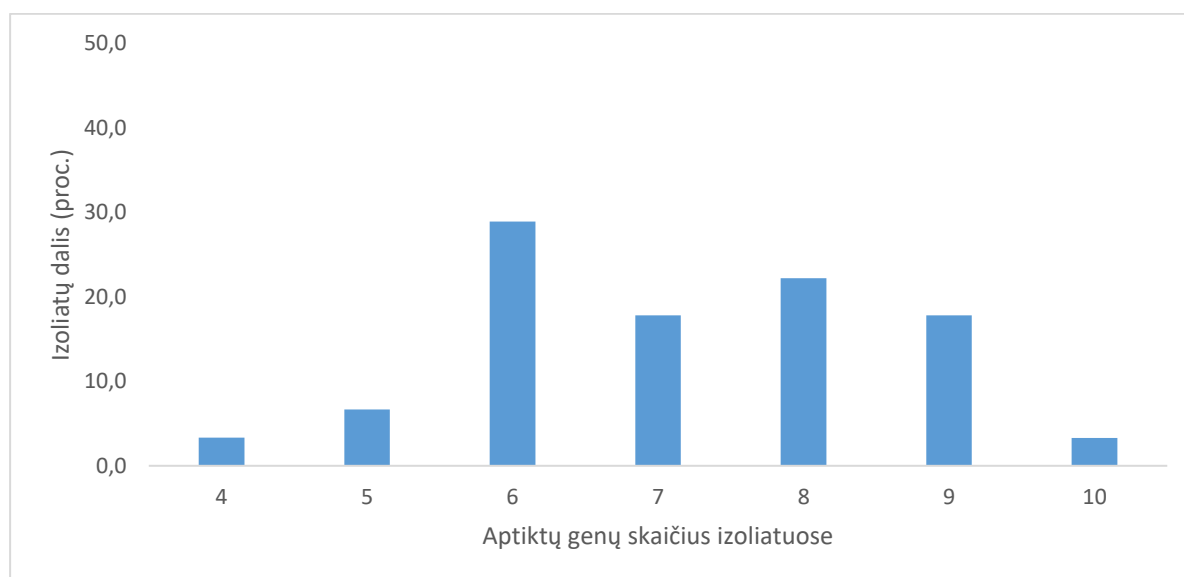
Vertinant vidutinį turimų genų skaičių santykinai nuo visų tirtų, ekstraląstelinės adhezijos genų paplitimas buvo reikšmingai didesnis nei tarpląstelinės adhezijos genų (49,4 proc. ir 40,8 proc. atitinkamai, $p < 0,05$).

Tirtas *spa* genas pasižymėjo polimorfizmu ir pagal amplifikuoto DNR fragmento dydį buvo suskirstytas į 3 grupes: < 350 bp, 350 – 400 bp, > 400 bp (6 pav.). Dauguma (81,1 proc.) izoliatų turėjo *spa* geną, kurio apmfilikuoto DNR fragmento dydis buvo nuo 350 bp iki 400 bp. 16,7 proc. izoliatų nustatytas mažesnis nei 350 bp amplifikuoto geno fragmento dydis ir vos dviejuose izoliatuose (2,2 proc.) nustatytas didesnis nei 400 bp PGR produkto dydis.



6 pav. PGR metodu nustatytas ir 1 proc. agarozės gelyje vizualizuotas *spa* genas

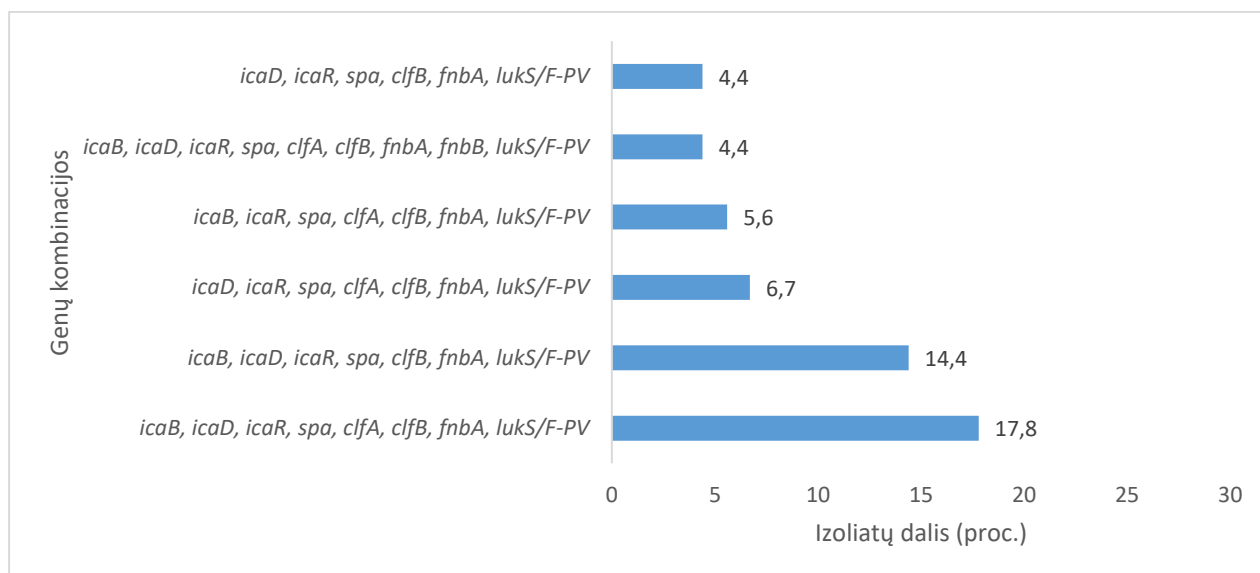
Skirtingi izoliatai pasižymėjo įvairiu genų rinkiniu. Dažniausiai nustatyti šešių genų rinkiniai, kuriuos turėjo 28,9 proc. izoliatų. Aštuonių genų kombinacijas turėjo 22,2 proc. izoliatų. Tiek septynis, tiek devynis genus turėjo 17,8 proc. tirtų izoliatų. Didžiausias nustatytas genų skaičius viename izoliate buvo 10, tačiau tai sudarė tik 3,3 proc. visų atvejų, o mažiausias nustatytas genų skaičius viename izoliate buvo 4 ir tai sudarė irgi 3,3 proc. visų tirtų izoliatų (7 pav.).



7 pav. Aptiktų genų, susijusių su bioplėvelių formavimu, skaičius tirtuose klinikiškuose MRSA izoliatuose

3.2.3. Dažniausios genų kombinacijos klinikiniuose MRSA izoliatuose

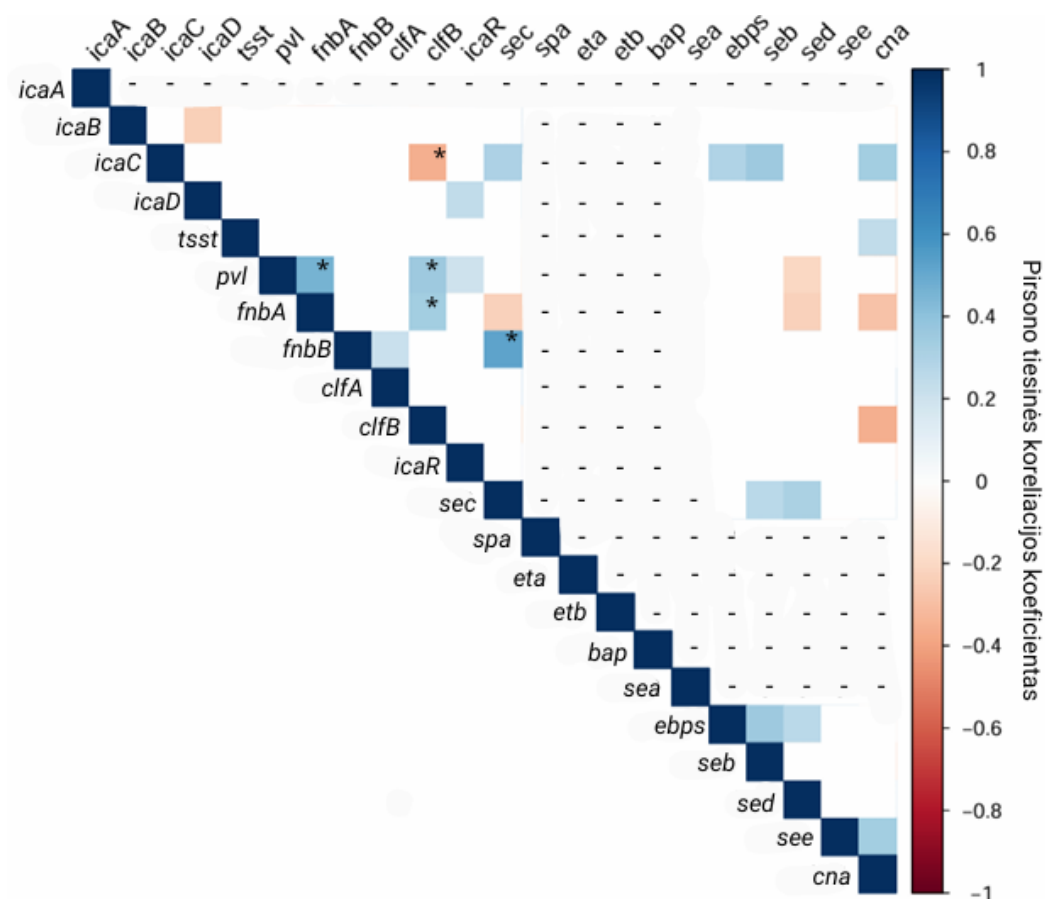
Dažniausiai pasitaikiusi genų kombinacija buvo: *icaB*, *icaD*, *icaR*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *fnbA* ir *lukS/F-PV*. Tokių genų rinkinį turėjo 17,8 proc. visų tirtų izoliatų. Antroji pagal dažnį kombinacija (14,4 proc.) buvo identiška, tačiau neturėjo *fnbB* geno. Trečia pagal dažnumą kombinacija (6,7 proc.) buvo: *icaD*, *icaR*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *lukS/F-PV*. Kitos retesnės, bet vis dar pasikartojančios kombinacijos buvo aptiktos nuo dviejų iki penkių izoliatų (2,2–5,6 proc) (8 pav).



8 pav. Dažniausios genų kombinacijos tirtuose klinikiniuose MRSA izoliatuose

3.2.3. Patogenezės mechanizmų ir bioplėvelių formavimo genų koreliacija klinikiniuose MRSA izoliatuose

Šiame tyrime buvo analizuojama, kaip dažnai patogenezės mechanizmus koduojantys genai pasireiškia kartu su bioplėvelių formavimą koduojančiais genais tirtuose klinikiniuose MRSA izoliatuose. Atlikta statistinė analizė parodė, jog toksinus koduojantys genai įvairiai koreliavo tiek tarpusavyje, tiek su genais, susijusiais su bioplėvelių formavimu. PVL toksiną koduojantis genas statistiškai reikšmingai teigiamai koreliavo su *fnbA* (0,469) ir *clfB* (0,358) genais ($p < 0,05$), t.y. esant PVL toksiną koduojančiam genui dažniau buvo aptinkami ir *fnbA* bei *clfB* genai. Genai *fnbA* ir *clfB* taip pat teigiamai koreliavo tarpusavyje (0,150). Reikšmingos teigiamos koreliacijos pastebėtos taip pat su *fnbB* genu, kuris teigiamai koreliavo su *sec* genu. Nors teigiamos koreliacijos buvo aptiktos dažniau, kai kurie genai vieni su kitais turėjo neigiamas koreliacijas. Pavyzdžiui, genas *icaC* statistiškai reikšmingai neigiamai koreliavo su *clfB* genu (-0,355) ($p < 0,05$) (9 pav.).



9 pav. Pirsono tiesinės koreliacijos koeficientai tarp tirtų genų. *koreliacija statistiškai reikšminga – $p < 0,05$; Kai kurioms koreliacijoms apskaičiuoti trūko duomenų (-).

3.3. Ryšys tarp genetinių virulentiškumo faktorių ir MRSA bioplėvelių formavimo stiprumo

Vienas iš šio tyrimo tikslų buvo nustatyti, ar egzistuoja ryšys tarp bioplėvelių formavimo stiprumo ir tam tikrų genų, susijusių su patogenezės mechanizmais, adhezija ir bioplėvelių formavimu, buvimu.

Tiek silpnai, tiek vidutiniškai bioplėveles formuojančiuose izoliatuose dažniausiai aptinkamas toksinus koduojantis *lukS/F-PV* genas pasiskirstė labai panašiai (~80 proc.), o enterotoksinų genai (*seb*, *sec*, *sed*, *see*) nustatyti tik silpnai bioplėveles formuojančiose grupėse. Tyrimo metu nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *seb* geno ir bioplėvelių formavimo stiprumo ($p > 0,05$). (7 lentelė).

7 lentelė. Toksinus koduojančių genų pasiskirstymas priklausomai nuo bioplėvelės formavimo stiprumo tiriuose klinikuose MRSA izoliatuose

	Bioplėvelės formavimo stiprumas			
Genai	Silpnas (n = 38) Proc. (abs. skč.)	Vidutiniškas (n = 46) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 84) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Toksinus koduojantys genai				
<i>lukS/F-PV</i>	84,21 (32)	76,1 (35)	79,8 (67)	p = 0,317
<i>tsst</i>	5,3 (2)	2,2 (1)	3,6 (3)	p = 0,866
Enterotoksinus koduojantys genai				
<i>sea</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>seb</i>	10,5 (4)	0,0 (0)	4,4 (4)	p = 0,047
<i>sec</i>	7,9 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 0,089
<i>sed</i>	7,9 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 0,089
<i>see</i>	2,6 (1)	0,0 (0)	2,2 (1)	-
Eksfoliacinius toksinus koduojantys genai				
<i>eta</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>etb</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-

Tyrimo duomenys parodė, kad tarp *ica* operone esančių genų ir bioplėvelių formavimo stiprumo nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingo ryšio (visi $p > 0,05$). Nors *icaD* genas dažniau aptiktas vidutiniškai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose (91,3 proc.) nei silpnai formuojančiuose (76,3 proc.), šis skirtumas nepasiekė statistinės reikšmės ribos ($p = 0,074$). Kiti genai pasiskirstė labai panašiai tarp dviejų grupių, bendros tendencijos nepastebėta (8 lentelė).

8 lentelė. Tarpląstelinės adhezijos baltymus koduojančių genų pasiskirstymas priklausomai nuo bioplėvelės formavimo stiprumo tirtuose klinikiuose MRSA izoliatuose

	Bioplėvelės formavimo stiprumas			
Genai	Silpnas (n = 38) Proc. (abs. skč.)	Vidutiniškas (n = 46) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 84) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
<i>ica</i> operono genai				
<i>icaA</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>icaB</i>	81,6 (31)	76,1 (35)	78,6 (66)	p = 0,731
<i>icaC</i>	18,4 (7)	28,3 (13)	23,8 (20)	p = 0,426
<i>icaD</i>	76,3 (29)	91,3 (42)	84,5 (71)	p = 0,074
<i>icaR</i>	97,4 (37)	95,7 (44)	96,4 (81)	p = 1
Baltymą A koduojantis genas				
<i>spa</i>	100 (38)	100 (46)	100 (84)	-
Su bioplėvelių formavimu susijusio baltymo genas				
<i>bap</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-

Kaip jau minėta anksčiau, tirtas *spa* genas pasižymėjo polimorfizmu ir pagal amplifikuoto DNR fragmento dydį buvo suskirstytas į 3 grupes: < 350 bp, 350 – 400 bp, > 400 bp. Vidutiniškai bioplėvelės formuojantys tirti MRSA klinikiniai izoliatai dažniau turėjo 350-400 bp PGR produktą, o silpnai formuojantys dažniau turėjo mažesnius amplifikuoto geno fragmentus. Tačiau šie rezultatai nebuvo statistiškai reikšmingi ($p > 0,05$). Kito dydžio PGR produktai pasiskirstė vienodai tarp silpnai ir vidutiniškai bioplėvelės formuojančių MRSA, tačiau kadangi jų buvo tik du, rezultatai nereprezentuoja visos populiacijos ir negali būti laikomi statistiškai reikšmingais.

Tarp bioplėvelių formavimo stiprumo ir adhezijos baltymus koduojančių genų paplitimo nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų ($p > 0,05$). Nors visi tirti genai buvo nustatyti panašiu dažniu tiek silpnai, tiek vidutiniškai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose, pastebėta bendra tendencija, jog izoliatai, turintys ekstraląstelinės adhezijos baltymus koduojančius genus procentaliai aktyviau formavo bioplėvelės, t.y. dažniau formavo vidutiniškas, o ne silpnas bioplėvelės. O vienas iš tirtų genų - *ebps* reikšmingai dažniau buvo aptinkamas vidutiniškai

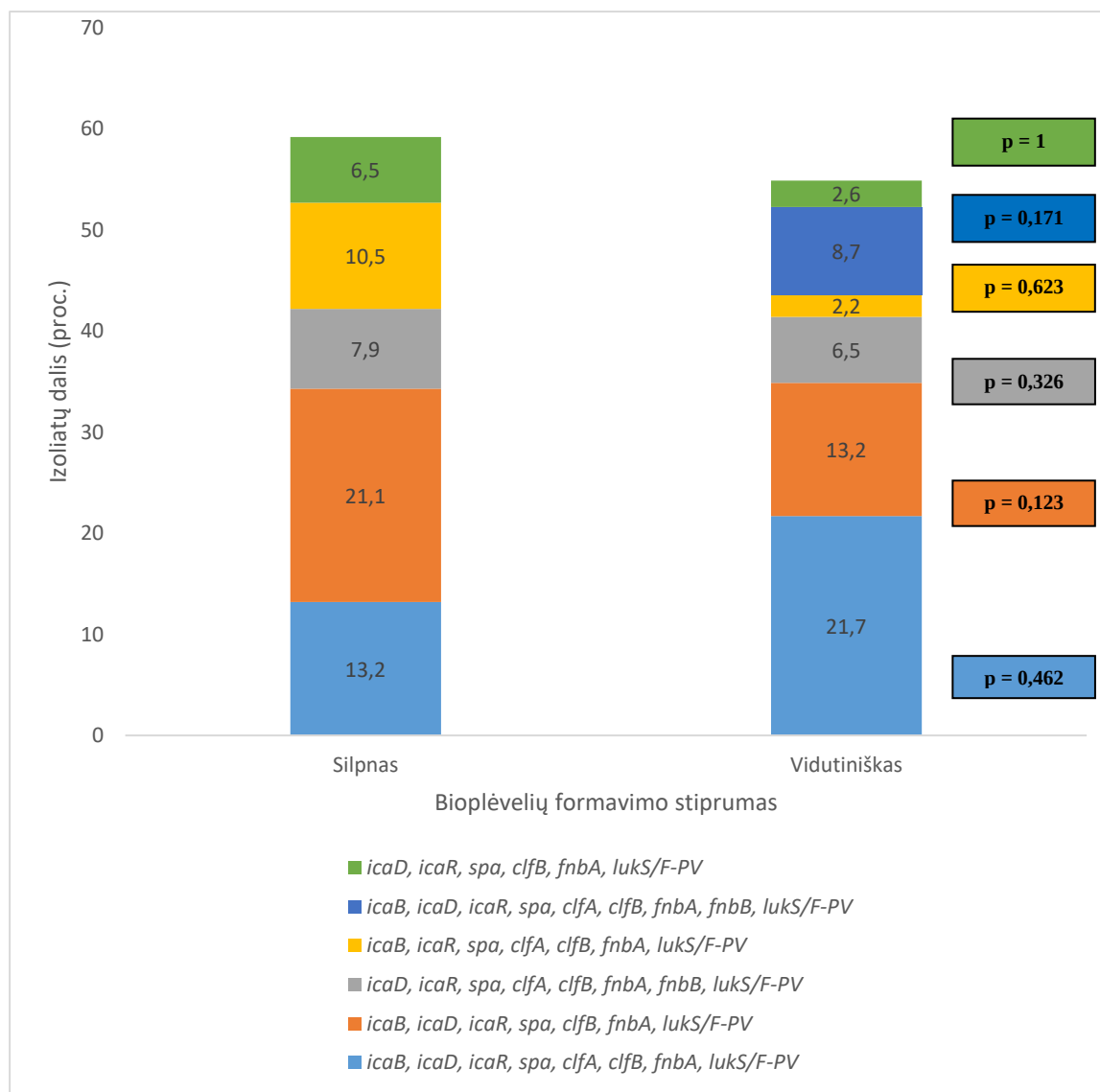
bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose (17,4 proc.) nei silpnai formuojančiuose (7,9 proc.) ($p = 0,05$) (9 lentelė).

9 lentelė. Ekstraląstelinės adhezijos baltymus koduojančių genų pasiskirstymas priklausomai nuo bioplėvelės formavimo stiprumo tirtuose MRSA klinikiuose izoliatuose

	Bioplėvelės formavimo stiprumas			
Genai	Silpnas (n = 38) Proc. (abs. skč.)	Vidutiniškas (n = 46) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 84) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Sukibimo faktorius koduojantys genai				
clfA	71,1 (27)	73,9 (34)	72,6 (61)	p = 1
clfB	84,2 (32)	89,1 (41)	88,1 (74)	p = 1
Kolageną surišantį baltymą koduojantis genas				
cna	13,2 (5)	17,3 (8)	15,5 (13)	p = 0,817
Elastiną surišantį baltymą koduojantis genas				
ebps	7,9 (3)	17,4 (8)	13,1 (11)	p = 0,050
Fibronektiną surišančius baltymus koduojantys genai				
fnbA	92,1 (35)	95,7 (44)	94,1 (79)	p = 0,654
fnbB	10,5 (4)	13,0 (6)	11,9 (10)	p = 1

Šiame tyrime taip pat buvo siekiama nustatyti, ar genų kombinacijos gali lemti bioplėvelių formavimo stiprumą. Šešių dažniausių genų kombinacijų paplitimas buvo palygintas tarp silpnai ir vidutiniškai bioplėvelės formuojančiais MRSA izoliatais. Nors tam tikri genų deriniai buvo dažnesni vienoje ar kitoje grupėje, statistiškai reikšmingo ryšio tarp konkrečių genų derinių ir bioplėvelių formavimo stiprumo nenustatyta (visi $p > 0,05$). Vis dėlto matoma tendencija, jog vidutiniškai bioplėvelės formuojantys MRSA dažniau pasižymi didesne genų įvairove, t.y. genų kombinacijos, kurias sudarė šeši ar mažiau genų, dažniau buvo paplitusios silpnai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose, o genų kombinacijos, kurias sudarė septyni ar daugiau genų, labiau buvo paplitusios vidutiniškai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose. Be to, dažniausias genų rinkinys su didžiausia

genų įvairovė (aštuoni genai) buvo aptiktas tik vidutiniškai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose (10 pav.).



10 pav. Dažniausių genų kombinacijų pasiskirstymas priklausomai nuo bioplėvelės formavimo stiprumo tirtuose klinikiniuose MRSA izoliatuose

3.4. Fenotipinių virulentiškumo faktorių paplitimas bei jų ryšys su MRSA gebėjimu formuoti bioplėvelės

3.4.1. Fenotipinių virulentiškumo faktorių paplitimas tarp tirtų izoliatų

Fenotipinio virulentiškumo faktorių tyrimo metu buvo vertintas trijų fermentų aktyvumas: lipazių, proteinazių ir želatinazių. Taip pat tirtas sideroforų išskyrimas. Lipazių aktyvumas buvo nustatytas visuose tirtuose izoliatuose. Želatinazių aktyvumas taip pat buvo vienas iš labiausiai

paplitusių – jį turėjo 94,4 proc. tirtų *S. aureus* izoliatų. Mažiau nei pusė izoliatų turėjo proteinazių aktyvumą (42,2 proc.). Sideroforus gamino 86,7 proc. izoliatų.

Pastebėta, jog dažniausiai izoliatai turėjo trys (54,4 proc.) ar visus keturis virulentiškumo veiksnius (35,6 proc.). 7,8 proc. turėjo du aktyvius virulentiškumo veiksnius ir tik 2,2 proc. izoliatų turėjo vieną aktyvų virulentiškumo veiksnį – fermentą lipazę.

3.4.2. Ryšys tarp fenotipinių virulentiškumo faktorių ir MRSA bioplėvelių formavimo stiprumo

Tyrimo metu buvo vertinta keturių virulentiškumo veiksnių (lipazių, proteinazių, želatinazių ir sideroforų) raiška priklausomai nuo izoliato bioplėvelės formavimo stiprumo. Želatinazės aktyvumas nustatytas dažniau vidutiniškai bioplėveles formuojančiuose izoliatuose (97,8 proc.) nei silpnai (89,5 proc.), bet šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Proteinazės ir sideroforų aktyvumas dažniau nustatytas silpnai bioplėveles formuojančiuose izoliatuose, bet šis skirtumas taip pat nebuvo reikšmingas. Nei vienas iš tirtų virulentiškumo veiksnių neturėjo statistiškai reikšmingos sąsajos su gebėjimu formuoti bioplėveles (10 lentelė).

10 lentelė. Virulentiškumo faktorių pasiskirstymas tirtuose MRSA izoliatuose priklausomai nuo bioplėvelės formavimo stiprumo

Virulentiškumo faktoriai	Bioplėvelės formavimo stiprumas			p
	Silpnas	Vidutiniškas	Iš viso	
	(n = 38) Proc. (abs. skč.)	(n = 46) Proc. (abs. skč.)	(n = 84) Proc. (abs. skč.)	
Lipazė	100 (38)	100 (46)	100 (84)	-
Proteinazė	44,7 (17)	36,9 (17)	40,5 (34)	p = 0,617
Želatinazė	89,5 (34)	97,8 (45)	94,0 (79)	p = 0,251
Sideroforai	94,7 (36)	80,4 (37)	86,9 (73)	p = 0,108

3.5. Genetinių ir fenotipinių virulentiškumo veiksnių tarpusavio sąsajos

Siekiant geriau suprasti MRSA patogenezės mechanizmus ir juos lemiančius faktorius, buvo analizuojama, kaip patogenezės mechanizmus, adheziją bei bioplėvelių formavimą koduojantys genai susiję su ekstraląstelinį fermentų ir/ar sideroforų aktyvumu. Kadangi lipazės aktyvumas buvo nustatytas visuose tirtuose izoliatuose, tolimesnė analizė su šiuo fermentu atliekama nebuvo.

Nustatyta, kad *lukS/F-PV* genas dažniau buvo aptinkamas tarp proteinazės teigiamų izoliatų (81,6 proc.) nei tarp proteinazės neigiamų (76,9 proc.), tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,785$). *tsst* ir *sec* genai buvo aptikti tik proteinazės teigiamuose izoliatuose (atitinkamai 7,9 proc. ir 7,9 proc.), o neigiamuose – visai neaptikti. *seb* genas taip pat nustatytas tik proteinazės aktyviuose izoliatuose (10,5 proc.) ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,029$) (x lentelė). Tačiau reikėtų atsižvelgti į labai mažą imtį, dėl kurios rezultatas gali būti klaidingai reikšmingas.

Tarp tarpląstelinius adhezijos baltymus koduojančių genų reikšmingas skirtumas pastebėtas tik *icaC* geno atveju – jis dažniau buvo aptinkamas proteinazės teigiamuose izoliatuose (39,5 proc.) nei neigiamuose (17,3 proc.) ($p = 0,035$). Kiti *ica* genai (*icaB*, *icaD*, *icaR*) buvo plačiai paplitę abiejose grupėse, be reikšmingo skirtumo.

Kalbant apie ekstraląstelinius adhezijos baltymus koduojančius genus, statistiškai reikšmingai dažniau proteinazės aktyviuose izoliatuose aptiktas *clfA* genas (86,8 proc. ir 63,5 proc. atitinkamai, $p = 0,025$) ir *ebps* (26,3 proc. ir 7,7 proc. atitinkamai, $p = 0,020$). Tuo tarpu *clfB* buvo dažniau aptiktas proteinazės neaktyviuose izoliatuose, tačiau šis skirtumas nepasiekė statistinio reikšmingumo ribos ($p = 0,068$). Kitų genų (*fnbA*, *fnbB*, *cna*) paplitimas tarp grupių reikšmingai nesiskyrė.

Taigi visi tirti genai, išskyrus *clfB*, teigiamai koreliavo su proteinazės aktyvumu, o *seb*, *icaC*, *clfA*, *ebps* genų buvimas statistiškai reikšmingai dažniau sutapo su proteinazės aktyvumu.

11 lentelė. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo proteazės aktyvumo

	Proteazės aktyvumas			
Genai	Proteinazė (+) (n = 38) Proc. (abs. skč.)	Proteinazė (-) (n = 52) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Toksinus koduojantys genai				
lukS/F-PV	81,6 (31)	76,9 (40)	78,9 (71)	p = 0,785
tsst	7,9 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 0,072

11 lentelės tęsinys. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo proteazės aktyvumo

	Proteazės aktyvumas			
Genai	Proteinazė (+) (n = 38) Proc. (abs. skč.)	Proteinazė (-) (n = 52) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Enterotoksinus koduojantys genai				
<i>sea</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>seb</i>	10,5 (4)	0,0 (0)	4,4 (4)	p = 0,029
<i>sec</i>	7,9 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 0,072
<i>sed</i>	5,3 (2)	1,9 (1)	3,3 (3)	p = 0,571
<i>see</i>	2,6 (1)	1,9 (1)	2,2 (2)	p = 1
<i>eta</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>etb</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Tarpląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
<i>icaA</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>icaB</i>	78,9 (30)	78,8 (41)	78,9 (71)	p = 1
<i>icaC</i>	39,5 (15)	17,3 (9)	26,7 (24)	p = 0,035
<i>icaD</i>	86,8 (33)	80,8 (42)	83,3 (75)	p = 0,633
<i>icaR</i>	97,4 (37)	96,2 (50)	96,7 (87)	p = 1
<i>spa</i>	100 (38)	100 (52)	100 (0)	-
<i>bap</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-

11 lentelės tęsinys. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo proteazės aktyvumo

	Proteazės aktyvumas			
Genai	Proteinazė (+) (n = 38) Proc. (abs. skč.)	Proteinazė (-) (n = 52) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Ekstraląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
<i>clfA</i>	86,8 (33)	63,5 (33)	73,3 (66)	p = 0,025
<i>clfB</i>	76,3 (29)	92,3 (48)	86,5 (77)	p = 0,068
<i>cna</i>	18,4 (7)	15,4 (8)	16,7 (15)	p = 0,924
<i>ebps</i>	26,3 (10)	7,7 (4)	15,6 (14)	p = 0,020
<i>fnbA</i>	97,4 (37)	92,3 (48)	94,4 (85)	p = 0,392
<i>fnbB</i>	13,2 (5)	9,6 (5)	11,1 (10)	p = 0,850

Apibendrinant želatinazės aktyvumo ryšį su tirtais genais, pastebėta, kad dauguma genų buvo dažni tiek želatinazės teigiamose, tiek neigiamose izoliatuose, o statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Apskritai, rezultatai neatskleidė aiškios koreliacijos tarp genų paplitimo ir želatinazės aktyvumo. Tačiau reikėtų atsižvelgti į tai, jog viena iš galimų priežasčių yra ypač neproporcingai pasiskirsčiusios grupės ir labai maža želatinazės neigiamų izoliatų imtis.

12 lentelė. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo želatinazės aktyvumo

	Želatinazės aktyvumas			
Genai	Želatinazė (+) (n = 85) Proc. (abs. skč.)	Želatinazė (-) (n = 5) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Toksinus koduojantys genai				
<i>lukS/F-PV</i>	80,0 (68)	60,0 (3)	78,9 (71)	p = 0,284
<i>tsst</i>	3,5 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 1

12 lentelės tęsinys. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo želatinazės aktyvumo

	Želatinazės aktyvumas			
Genai	Želatinazė (+) (n = 85) Proc. (abs. skč.)	Želatinazė (-) (n = 5) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Enterotoksinus koduojantys genai				
sea	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
seb	3,5 (3)	20,0 (1)	4,4 (4)	p = 0,208
sec	2,4 (2)	20,0 (1)	3,3 (3)	p = 0,159
sed	3,5 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 1
see	2,4 (2)	0,0 (0)	2,2 (2)	p = 1
eta	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
etb	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Tarpląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
icaA	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
icaB	77,6 (66)	100 (5)	78,9 (71)	p = 0,579
icaC	25,9 (22)	40,0 (2)	26,7 (24)	p = 0,606
icaD	83,5 (71)	80,0 (4)	83,3 (75)	p = 1
icaR	96,5 (82)	100 (5)	96,7 (87)	p = 1
spa	100 (85)	100 (5)	100 (90)	-
bap	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-

12 lentelės tęsinys. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo želatinazės aktyvumo

	Želatinazės aktyvumas			
Genai	Želatinazė (+) (n = 85) Proc. (abs. skč.)	Želatinazė (-) (n = 5) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Ekstraląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
<i>clfA</i>	74,1 (63)	60,0 (3)	73,3 (66)	p = 0,606
<i>clfB</i>	84,7 (72)	100 (5)	86,5 (77)	p = 1
<i>cna</i>	17,6 (15)	0,0 (0)	16,7 (15)	p = 0,585
<i>ebps</i>	14,1 (12)	40,0 (2)	15,6 (14)	p = 0,171
<i>fnbA</i>	95,3 (81)	80,0 (4)	94,4 (85)	p = 0,254
<i>fnbB</i>	9,4 (8)	40,0 (2)	11,1 (10)	p = 0,093

Tiriant ar sideroforų aktyvumas gali būti susijęs su tirtais genais, bendrai matoma tendencija, kad bakterijos turinčios tirtus genus dažniau gamino sideroforus, o *fnbA* geno atveju ši teigiama koreliacija buvo statistiškai reikšminga (p = 0,016). Tačiau *cna* ir *icaC* genai išsiskyrė iš bendros tendencijos – izoliatai su šiais genais rečiau gamino sideroforus ir šis rezultatas buvo statistiškai reikšmingas (p < 0,05) (x lentelė).

13 lentelė. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo sideroforų aktyvumo

	Sideroforų aktyvumas			
Genai	Sideroforai (+) (n = 78) Proc. (abs. skč.)	Sideroforai (-) (n = 12) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Toksinus koduojantys genai				
<i>lukS/F-PV</i>	79,5 (62)	75,0 (9)	78,9 (71)	p = 0,712
<i>tsst</i>	3,8 (3)	0 (0)	3,3 (3)	p = 1
<i>sea</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-

13 lentelės tęsinys. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo sideroforų aktyvumo

	Sideroforų aktyvumas			
Genai	Sideroforai (+) (n = 78) Proc. (abs. skč.)	Sideroforai (-) (n = 12) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Toksinus koduojantys genai				
<i>seb</i>	5,1 (4)	0,0 (0)	4,4 (4)	p = 1
<i>sec</i>	3,8 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 1
<i>sed</i>	3,8 (3)	0,0 (0)	3,3 (3)	p = 1
<i>see</i>	2,6 (2)	0,0 (0)	2,2 (2)	p = 1
<i>eta</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>etb</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Tarpląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
<i>icaA</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
<i>icaB</i>	79,5 (62)	75,0 (9)	78,9 (71)	p = 0,712
<i>icaC</i>	21,8 (17)	58,3 (7)	26,7 (24)	p = 0,021
<i>icaD</i>	84,6 (66)	75,0 (9)	83,3 (75)	p = 0,414
<i>icaR</i>	97,4 (76)	96,7 (11)	96,7 (87)	p = 0,352
<i>spa</i>	100 (78)	100 (12)	100 (0)	-
<i>bap</i>	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	-
Ekstraląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
<i>clfA</i>	73,1 (57)	66,7 (9)	73,3 (66)	p = 0,504
<i>clfB</i>	87,2 (68)	75,0 (9)	86,5 (77)	p = 0,202
<i>cna</i>	12,8 (10)	41,7 (5)	16,7 (15)	p = 0,036
<i>ebps</i>	16,7 (13)	8,3 (1)	15,6 (14)	p = 0,683

13 lentelės tęsinys. Tirtų genų pasiskirstymas MRSA izoliatuose priklausomai nuo sideroforų aktyvumo

	Sideroforų aktyvumas			
Genai	Sideroforai (+) (n = 78) Proc. (abs. skč.)	Sideroforai (-) (n = 12) Proc. (abs. skč.)	Iš viso (n = 90) Proc. (abs. skč.)	p reikšmė
Ekstraląstelinės adhezijos baltymus koduojantys genai				
<i>fnbA</i>	97,4 (76)	75,0 (9)	94,4 (85)	p = 0,016
<i>fnbB</i>	12,8 (10)	11,1 (0)	11,1 (10)	p = 0,347

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Tyrimų, nagrinėjančių klinikinių MRSA izoliatų genetinį profilį ir virulentiškumo veiksnius Lietuvoje yra labai nedaug. Esami tyrimai dažniausiai analizuoja skirtumus tarp MRSA ir MSSA nesifokusuojant į detalesnį ir kompleksinį virulentiškumą sąlygojantį genetinį profilį. Be to, labai trūksta tyrimų išimtinai su MRSA. Esami darbai dažnai apsiriboja nedideliais izoliatų skaičiais, o analizuojamų virulentiškumo veiksnių spektras yra ribotas. Turimi tyrimai daugiausia dėmesio skiria pavieniams genams (*lukS/F-PV*, *mecA*, *spa*) ar fenotipiniams bruožams, tokiems kaip toksinų gamyba ar atsparumas antibiotikams (Žaneta Maželienė ir kt., 2022; Agnė Kirkliauskienė ir kt., 2024), tačiau išsamių, kompleksinių analizių, kurios apimtų ir genetinius, ir fenotipinius virulentiškumo aspektus, vis dar trūksta ne tik Lietuvoje, bet ir pasaulyje. Šis informacijos stygius apsunkina MRSA izoliatų virulentiškumo profilio vertinimą ir gali riboti efektyvių infekcijų kontrolės bei gydymo strategijų kūrimą. Šiame darbe buvo tirti 22 MRSA virulentiškumo genai ir 5 fenotipiniai virulentiškumo veiksniai. Tai pirmas Lietuvoje tyrimas, kuris apima didesnę MRSA klinikinių izoliatų skaičių ir nagrinėja tokį platų genetinį virulentiškumo veiksnių spektrą.

4.1. Patogenezės mechanizmus koduojančių genų paplitimas

Nustatytas ryšys tarp toksinų ir tam tikrų ligų bei virulentiškumo skatina nuodugnesnį MRSA patogenezės mechanizmus koduojančių genų tyrimus (Zeinab Fagheei Aghmiyuni ir kt., 2024). PVL yra vienas svarbiausių MRSA virulentiškumo veiksnių. Šis poras formuojantis toksinas yra susijęs su audinių nekroze ir taip pat sukelia leukocitų membranų pažeidimą (Khawar Hussain ir kt., 2022; Amit Karmakar ir kt., 2018). PVL gamina ne visi *S. aureus* kamienai, bet reikšmingai dažniau šis genas randamas tarp MRSA kamienų, nei tarp MSSA (Mohamed Shohayeb ir kt., 2023; Zeinab Fagheei Aghmiyuni ir kt., 2024). PVL koduojančio geno paplitimas tarp MRSA izoliatų skirtingose pasaulio vietose labai įvairus ir netolygus - gali varijuoti nuo 5 proc. iki 100 proc. (Birutė Petraitienė, 2020; Dharm R. Bhatta ir kt., 2016). Kai kuriose Pietų Europos šalyse MRSA PVL teigiami atvejai yra retesni. Mažiausias paplitimas (< 10 proc.) nustatytas Pietvakarių Europoje. Tuo tarpu PVL toksino genas ypač dažnas Šiaurės Rytų Europoje, įskaitant Lietuvą, Latviją, Lenkiją (Birutė Petraitienė, 2020). Lietuvoje atliktas tyrimas parodė, jog PVL toksiną koduojantis genas buvo paplitęs tarp 42,2 proc. tirtų MRSA izoliatų (Agnė Kirkliauskienė ir kt., 2024). Mūsų tyrimo duomenys parodė ženkliai didesnę paplitimo dažnį – 78,2 proc. Pastaruoju metu visame pasaulyje pastebimas padidėjęs PVL teigiamų *S. aureus* paplitimas (Khawar Hussain ir kt., 2022; Hiroshi Kaneko ir kt., 2023). Todėl neatmetama galimybė, jog bendras šio geno paplitimas *S. aureus* kamienuose didėja ir Lietuvoje, tačiau reikia atlikti daugiau tyrimų, siekiant patvirtinti šį teiginį.

Toksinio šoko sindromo toksinas, kurį koduoja genas *tsst*, sukelia ūmias gyvybei pavojingas infekcijas skatindamas citokinų, tokių kaip IL-1, IL-2, TNF- α ir kt., išsiskyrimą. MRSA gaminantis

ši toksiną gali padidinti sunkesnių simptomų riziką infekcijos metu. Tchamou MF Potindji ir kt. (2022) parodė, kad šis genas buvo aptiktas tik pavieniais atvejais, maždaug 2,63 proc. MRSA izoliatų, Marinda Dwi Puspitarini ir kt. (2021) nustatė panašų šio geno paplitimą – 3,8 proc. Mūsų tyrime šis genas buvo aptiktas 3,3 proc. MRSA izoliatų ir atitinka minėtų autorių duomenis.

Stafilokokų enterotoksinais yra pagrindinė apsinuodijimo maistu priežastis daugelyje pasaulio šalių. Ypač Pietryčių Azijoje šių apsinuodijimų maistu dažnis išlieka didelis dėl šilto ir drėgno klimato. Nors dominuojančių MRSA enterotoksinus koduojančių genų paplitimas Europoje ir Šiaurės Amerikoje nėra didelis, jis gali skirtis priklausomai nuo šalies (Mirian Yuliza Rubio Cieza ir kt., 2024; Diana Oliveira ir kt., 2018). Pavyzdžiui, Lenkijoje atlikto tyrimo duomenimis, 25 proc. MRSA izoliatų buvo aptiktas enterotoksina koduojantis *sea* genas, o kiti enterotoksinų genai buvo nustatyti tik keliuose izoliatuose (Barbara Kot ir kt., 2022). Portugalijoje *sea* - *see* genai buvo aptikti tik pavieniais atvejais (Ricardo Oliveira ir kt., 2022). Šiame tyrime visų tirtų enterotoksinus koduojančių genų (*sea* - *see*) paplitimas buvo labai mažas (iki 4,4 proc.).

Šiame tyrime nebuvo aptikta nė vieno MRSA izoliato, turinčio *eta* ir *etb* geną, o tai atitinka kitų autorių pateiktus rezultatus, kur šie genai buvo nustatyti tik pavieniais atvejais (Tchamou MF Potindji ir kt., 2022).

Taigi, šio tyrimo rezultatai atitinka anksčiau publikuotus duomenis iš kitų šalių, nurodančius panašų toksinus koduojančių genų paplitimą tarp MRSA izoliatų. Vis dėlto, svarbu atkreipti dėmesį į galimai didėjantį PVL toksiną koduojančio geno paplitimą.

4.2. Patogenezės mechanizmus koduojantys genai ir MRSA gebėjimas formuoti bioplėveles

Bioplėvelių formavimas yra dar vienas labai svarbus veiksnys, padedantis MRSA bakterijoms sukelti ligas, išvengti imuninės sistemos ir tapti atsparioms antibiotikams. Todėl svarbu tirti ir suprasti MRSA bioplėvelių formavimo mechanizmus ir sąlygojančius veiksnius (Khasawneh ir kt., 2020).

Literatūroje vis dažniau akcentuojama, kad MRSA kamienai geba stipriau formuoti bioplėveles, nei meticilinui jautrūs *S. aureus* kamienai. Tyrimai parodo statistiškai reikšmingą ryšį tarp *mecA* geno ir bioplėvelių formavimo, tačiau kaip būtent *mecA* genas veikia šią savybę vis dar nėra aišku. Svarbu suprasti, ar kiti genai irgi gali turėti įtakos bioplėvelių formavimui (Zeinab Fagheei Aghmiyuni ir kt., 2024). Šis tyrimas siekia geriau suprasti MRSA genetinį profilį ir jo sąsajas su bioplėvelių formavimu. Nustačius MRSA gebėjimą formuoti bioplėveles, buvo analizuojama ar bioplėvelių formavimui daro įtaką virulentiškumo genai.

Remiantis literatūroje pateiktais duomenimis, MRSA bioplėvelių paplitimas gali labai skirtis ir varijuoja nuo 10 iki 100 proc. (Khadijeh Bamneshin ir kt., 2024). 2022 m. Lietuvoje atliktas tyrimas

parodė, jog 60 proc. tirtų MRSA klinikinių izoliatų formavo bioplėveles. Iš jų 34 proc. bioplėveles formavo vidutiniškai, o 26 proc. – stipriai (Žaneta Maželienė ir kt., 2022). Tačiau 2024 m. atlikta metaanalizė parodė, jog dažniausiai MRSA bioplėvelių paplitimas yra didesnis. Minėto tyrimo duomenimis, dauguma MRSA izoliatų – 95,4 proc. gebėjo formuoti bioplėveles. Iš jų 26,9 proc. bioplėveles formavo stipriai, 33,5 proc. formavo vidutiniškai, o 30,6 proc. – silpnai. Panašūs rezultatai gauti ir šiame tyrime - beveik visi (97,8 proc.) tirti MRSA klinikiniai izoliatai formavo bioplėveles (Khadijeh Bamneshin ir kt., 2024). Tačiau MRSA kamienų pasiskirstymas pagal bioplėvelių formavimo aktyvumą skirtinguose tyrimuose dažnai labai varijuoja. Šiame tyrime nustatyta, jog pusė (51,1 proc.) tirtų izoliatų bioplėveles formavo vidutiniškai, 42 proc. – silpnai, o likę stipriai (4,4 proc.) arba neformavo visai (2,2 proc.). Šie rezultatai sutampa su Nabi Jomehzadeh ir kt. (2025) tyrimu.

Naujausi tyrimai atskleidžia reikšmingą sąsają tarp *lukS/F-PV* geno buvimo ir bioplėvelių formavimo stiprumo. Remiantis Zeinab Fagheei Aghmiyuni ir kt. (2024) tyrimo duomenimis, PVL teigiami *S. aureus* izoliatai dažniausiai pasižymėjo silpnu arba vidutinišku, bet ne stipriu bioplėvelės formavimo gebėjimu. Panašias išvadas pateikė ir Nilufer Cakır Aktas ir kt. (2013), kurie pabrėžė, kad bioplėvelės formavimas, o ne *pvl* geno buvimas, gali būti svarbesnis virulentiškumo veiksnys. Šią tendenciją iš dalies atspindi ir mūsų tyrimo rezultatai – visi tirti patogeniškumo genai, įskaitant PVL toksiną koduojantį geną - *lukS/F-PV*, dažniau buvo aptinkami izoliatuose, pasižyminčiuose silpnu bioplėvelės formavimu. Nors šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas, jis atitinka kitų autorių pastebėjimus, kad šis genas dažniau būdingas izoliatams su mažesniu bioplėvelės formavimo aktyvumu. Tai leidžia manyti, kad PVL toksinas susijęs su ūmiu patogeniškumu, o ne su lėtine kolonizacija, kuriai būtinas aktyvus bioplėvelės formavimas.

Mūsų tyrime taip pat pastebėta panaši tendencija su kitais toksinus koduojančiais genais - visi tyrime aptikti enterotoksinus koduojantys genai (*seb*, *sec*, *sed*, *see*) nustatyti tik silpnai bioplėveles formuojančiose grupėse. Be to, tyrimo metu nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *seb* geno ir bioplėvelių formavimo stiprumo. Tai rodo, kad skirtingi virulentiškumo mechanizmai gali veikti pagal skirtingą „strategiją“ – bakterija pasirenka greitam plitimui reikalingas savybes arba ilgalaikiam išlikimui. Vis dėlto svarbu pažymėti, kad šiuo metu trūksta išsamių tyrimų, nagrinėjančių ryšį tarp bioplėvelių formavimo ir kitų toksinus koduojančių genų. Dėl mažo tokių genų paplitimo tyrimų rezultatai dažnai būna riboti. Mūsų tyrimo metu visi kiti tirti toksinus koduojantys genai buvo aptikti tik tarp silpnai bioplėveles formuojančių izoliatų, bet dėl mažos imties sunku vertinti rezultatus. Šie duomenys dar kartą pabrėžia poreikį išplėsti tyrimus siekiant suprasti, kaip toksinų genai sąveikauja su bioplėvelės formavimu.

4.3. Bioplėvelių formavimą lemiantys genai ir MRSA gebėjimas formuoti bioplėveles

Vis dažniau atliekami tyrimai siekiant nustatyti ryšį tarp *S. aureus* bioplėvelių formavimo stiprumo ir tam tikrų adheziją lemiančių genų. Plačiausiai ištirtas yra *ica* operonas (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*), kuris koduoja PIA sintezę, svarbų bioplėvelės komponentą (Khadijeh Bamneshin ir kt., 2024). Be to, svarbus vaidmuo bioplėvelių vystymosi procese tenka ir MSCRAMM grupės baltymų genams, tokiems kaip *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*, *cna* ir *ebpS*, kurie koduoja baltymus, prisitvirtinančius prie šeimininko audinių komponentų – fibronektino, fibrinogeno, kolageno ir elastino. Šie baltymai lemia efektyvią pradinę bakterijų adheziją prie paviršių – svarbų žingsnį bioplėvelės susidarymo pradžioje. Kai kurie tyrimai parodė, kad šių genų buvimas gali būti susijęs su stipresniu bioplėvelės formavimu (Khadijeh Bamneshin ir kt., 2024; Chi-Hsiang Lai ir kt., 2024; Yun Li Chan ir kt., 2024)

Daugybė tyrimų įrodė ryšį tarp *S. aureus* bioplėvelių formavimo ir *ica* operono buvimo (Ana Carolina Silva-de-Jesus ir kt., 2025). Vis dėlto, Khadijeh Bamneshin ir kt. 2024 m. apžvalgos duomenys parodė, kad *ica* operono genų paplitimas svyravo nuo 28,0 iki 51,5 proc., o bendras *ica* operono genų paplitimas *S. aureus* kamienuose siekė 42,4 proc. Toks paplitimas rodo, kad *S. aureus* formuojamos bioplėvelės priklauso ne tik nuo šių genų buvimo – yra ir kitų, nuo šių genų nepriklausomų mechanizmų. Anis Mohammadi ir kt. (2020) irgi pastebėjo, kad MRSA kamienai, kurie neturėjo nei vieno *ica* geno, vis tiek stipriai formavo bioplėveles. Mūsų tyrime *icaA* genas nebuvo aptiktas nė viename iš tirtų MRSA izoliatų, taip pat *icaC* geno paplitimas siekė tik 23,8 proc., o *icaR* genas, žinomas kaip neigiamas reguliatorius, slopinantis nuo *ica* operono priklausomą bioplėvelių formavimą, buvo aptiktas beveik visuose izoliatuose (96,4 proc.). Tai patvirtina kitų autorių išvadas, kad MRSA kamienai gali naudoti papildomus bioplėvelių formavimo mechanizmus.

Pastebėta, kad meticilinui jautrūs *S. aureus* (MSSA) kamienai dažnai formuoja iš PIA sudarytas bioplėveles, t.y. jų bioplėvelių formavimas priklauso nuo *ica* operono. Tuo tarpu MRSA bioplėvelių matricoje dominuoja ekstraląstelinė DNR ir baltymai ir tokių bioplėvelių formavimas priklauso nuo alternatyvių mechanizmų. Yra žinoma, jog tokius alternatyvius mechanizmus sąlygoja baltymas A, paviršiniai baltymai (pavyzdžiui, baltymas BAP) ar fibronektiną jungiantys baltymai (Merino ir kt., 2009). Mūsų tyrime nebuvo aptiktas *bap* genas, tačiau visi tirti izoliatai turėjo *spa* geną, o fibronetkiną surišantį baltymą koduojantis genas *fnbA* buvo labai paplitęs tirtuose klinikuose MRSA izoliatuose (94,4 proc.). Tai suteikia pagrindą manyti, jog mūsų tirti MRSA izoliatai bioplėveles formavo nepriklausomai nuo *ica* operono ir naudojo alternatyvius mechanizmus, kuriuos galbūt sąlygojo plačiai paplitę *spa* ir *fnbA* genai. Tačiau nei *ica* operono genai, nei alternatyvius bioplėvelių formavimo mechanizmus koduojantys genai neturėjo statistiškai reikšmingo ryšio su MRSA gebėjimu formuoti bioplėveles.

Kitų autorių tyrimuose irgi pastebėta, jog *bap* genas MRSA klinikiniuose izoliatuose aptinkamas retai, šis genas dažniaus sutinkamas gyvūninės kilmės izoliatuose. Pavyzdžiui, Hossein Goudarzi ir kt. (2020) tyrime *bap* genas buvo nustatytas tik viename klinikiniam izoliatui. Tai rodo, kad nors *bap* genas gali prisidėti prie bioplėvelių formavimo, jis nėra plačiai paplitęs MRSA kamienuose. Tuo tarpu *spa* genas yra plačiai paplitęs *S. aureus* izoliatuose (Abdulah N S ir kt., 2022; Gurjeet Singh ir kt., 2020)

S. aureus baltymas A, koduojamas geno *spa*, yra ląstelės sienelės komponentas, trukdantis neutrofilams vykdyti fagocitozę. Šis genas turi išskirtinį X-segmentą, kurio nedidelė dalis – XR-regionas – pasižymi dažniais pasikartojimais (apie 24 nukleotidų ilgio pasikartojimai). Dėl pasikartojančių sekų variacijos XR regione *spa* genas pasižymi polimorfizmu. Šių pasikartojimų skaičius skiriasi tarp skirtingų kamienų, tačiau jie neturi įtakos geno raiškai (Xin Wang, 2020). Geno *spa* analizė parodė, kad šiame tyrime aptiktų amplifikuoto *spa* geno fragmentų dydžių įvairovė buvo kaip Sri Amelia ir kt. (2023) tyrime. Kitų autorių atlikti tyrimai parodė, kad *spa* geno įvairovė gali būti didesnė. Kai kurie tyrimai parodė, kad tam tikri *spa* tipai, pasižymintys skirtingu X regiono ilgiu, gali būti susiję su kamienais, formuojančiais stipresnes ar silpnesnes bioplėveles (Abdulah N S ir kt., 2022), tačiau mūsų tyrime *spa* geno tipavimas nebuvo atliktas, o *spa* geno amplifikuoto fragmento ilgis nebuvo susijęs su bioplėvelės formavimo stiprumu.

Ekstraląstelinės adhezijos baltymai irgi yra susiję su bioplėvelių formavimu, o jų paplitimas ir ryšys su bioplėvelių formavimo aktyvumu ypač dažnai tiriamas (Jingyi Yu ir kt., 2024; Chi-Hsiang Lai ir kt., 2024). Mūsų tyrime tiek sukibimo faktorius koduojantys genai (*clfA*, *clfB*), tiek jau prieš tai minėtas fibronektiną surišantį baltymą koduojantis genas *fnbA* buvo dažnai aptinkami tirtuose klinikuose MRSA izoliatuose, jų paplitimas siekė 72-94 proc. Toks minėtų genų paplitimas nustatytas ir kitų autorių tyrimuose. Pabrėžiama, jog šie genai dažniausiai randami bioplėvelės formuojančiuose MRSA (Ghasem Azizi Leila ir kt., 2025; Chi-Hsiang Lai ir kt., 2024; Dali Wang ir kt., 2024, Mehdi Goudarzi ir kt., 2019). Tą patvirtina ir mūsų tyrimas, nes *fnbA* ir *clfB* genai statistiškai reikšmingai teigiamai koreliavo tarpusavyje.

Kolagenas yra gausiausia baltymų grupė organizme ir pagrindinė jungiamojo audinio sudedamoji dalis. *cna* genas laikomas svarbiu virulentiškumo veiksnio stafilokokų infekcijose. Mūsų izoliatuose *cna* geno paplitimas siekė 15,5 proc. Panašus šio geno paplitimas buvo nustatytas Fahimeh Nourbakhsh ir kt. (2016). Didelis šio geno paplitimas buvo nustatytas Chi-Hsiang Lai ir kt. (2024) (58,3 proc.). Šio tyrimo metu nustatyti *cna* geno paplitimo skirtumai tikėtina yra susiję su *Staphylococcus aureus* genotipo paplitimo skirtumais skirtingose šalyse.

Elastinas yra pagrindinis elastinių skaidulų komponentas – tai baltymai, suteikiantys jungiamajam audiniui tvirtumo ir elastingumo. Mes nustatėme, kad *ebpS* genas buvo aptiktas

13,1 proc. tirtų izoliatų. Nors kai kurie tyrimai parodo labai panašų šio geno paplitimą, dažnai jis gali siekti ir 50-90 proc. (Barbara Kot ir kt., 2022).

Šiuo metu vis dar trūksta pakankamai išsamių tyrimų, kurie leistų susidaryti vienareikšmę nuomonę apie konkrečių genų įtaką MRSA gebėjimui formuoti bioplėveles. Nors mokslinėje literatūroje minimi keli genai, tokie kaip *icaA*, *icaD*, *fnbA*, *bap*, kurie gali būti siejami su stipresniu bioplėvelių formavimu, bendras vaizdas išlieka fragmentiškas ir nevienodas (Jingyi Yu ir kt., 2024; Khadijeh Bamneshin ir kt., 2024). Skirtingi tyrimų metodai, geografiniai regionai, izoliatų kilmė taip pat fenotipinio bioplėvelės vertinimo skirtumai apsunkina rezultatų palyginimą ir interpretaciją. Mūsų tyrime pastebėta tendencija, kad izoliatai, turintys genus, koduojančius ekstraląstelinius adhezijos baltymus, dažniau sudarė vidutinio stiprumo bioplėveles nei silpnas, tai rodo didesnę jų bioplėvelės formavimo aktyvumą. Tačiau reikšmingas ryšys nustatytas tik *ebps* genui – jis dažniau buvo aptinkamas vidutiniškai bioplėveles formuojančiuose izoliatuose (17,4 proc.) nei silpnai formuojančiuose (7,9 proc.). Daugiau reikšmingų ryšių tarp tirtų genų ir bioplėvelių formavimo stiprumo nepastebėta.

4.4. Ekstraląstelinių fermentų ir sideroforų sąveika su virulentiškumo genais

S. aureus virulentiškumą lemia daugybė veiksnių, tarp jų – ekstraląsteliniai fermentai ir sideroforai, kurie atlieka svarbų vaidmenį infekcijos vystymesi. MRSA gaminamos lipazės, želatinazės, proteazės ir sideroforai prisideda prie audinių pažeidimo, kolonizacijos bei plitimo šeimininko organizme. Ypač svarbu tai, kad šie egzofermentai ne tik pažeidžia šeimininko audinius, bet ir stabilizuoja kitus virulentiškumo veiksnius – tiek sekretuojamus, tiek susijusius su ląstelės sienele (Kayan Tam ir kt., 2021). Taip pat pabrėžiamas sideroforų – geležį surišančių molekulių – vaidmuo, kurie leidžia bakterijoms išgyventi ir daugintis žmogaus organizme esant ribotam geležies kiekiui. Šių virulentiškumo veiksnių analizė yra svarbi siekiant geriau suprasti MRSA patogenezę, tačiau tokių tyrimų vis dar labai trūksta (Warinda Prommachote ir kt., 2025; Ghassan Ghssein ir kt., 2022).

MRSA lipazės yra fermentai, skaidantys riebalus ir lipidus. Jie padeda bakterijai sukelti ligą ir išvengti šeimininko imuninės sistemos. Tai svarbu MRSA išlikimui ir virulentiškumui. Be to, lipazės gali prisidėti prie bioplėvelės formavimosi. Mūsų tyrime visi tirti klinikiniai MRSA izoliatai gamino lipazes, kaip ir beveik visi formavo bioplėveles. Toks didelis lipazės aktyvumo paplitimas sutampa ir su kitų autorių tyrimais (Seraphine Nkie Esemu ir kt., 2024).

Mūsų tyrime ekstraląstelinį proteazių aktyvumą demonstravo 42,2 proc. tirtų izoliatų, o tai yra mažiau nei kai kuriuose kituose tyrimuose (Amit Karmakar ir kt., 2016), tačiau vis tiek rodo reikšmingą šio virulentiškumo veiksnio paplitimą tarp MRSA kamienų. Pastebėta, kad

ekstraląstelinės proteazės gali veikti kaip svarbūs infekcijos reguliatoriai, padedantys kontroliuoti infekcijos eigą. Stacey L. Kolar ir kt. (2013) proteomikos analizė parodė, jog pašalinus proteazes, daugiau kaupėsi tiek sekretuojamų toksinų (PVL, α -toksinas), tiek paviršinių baltymų (ClfA, FnbA). Tai rodo, kad proteazės padeda reguliuoti toksinų ir virulentiškumo faktorių stabilumą, t. y., jų skaidymu palaiko infekcijos pusiausvyrą. Didelis sekretuojamų toksinų ir kitų virulentiškumo faktorių kiekis gali labai greitai nužudyti šeimininką. Tačiau tai nėra naudinga pačiai bakterijai, nes jei šeimininkas miršta per greitai, bakterija neturi laiko plisti. Todėl įjungdama toksinų ir kitų virulentiškumo faktorių veikimą tik tada, kai proteazės taip pat aktyvios, bakterija automatiškai apsisaugo nuo per didelio žalingumo (Brittney D Gimza ir kt., 2021). Mūsų tyrime visi tirti genai, išskyrus *clfB*, teigiamai koreliavo su proteinazės aktyvumu, o *seb*, *icaC*, *clfA*, *ebps* genų buvimas statistiškai reikšmingai dažniau sutapo su proteinazės aktyvumu. Tai patvirtina ir kitų autorių pastebėjimus, kad ekstraląstelinės proteazės gali skaidyti išskiriamus toksinus ir sukibimo faktorius tam, kad reguliuotų virulentiškumo veiksnių kiekį. Taigi proteazės gali reguliuoti įvairių virulentiškumo faktorių koduojančių genų raišką ir aktyvumą, taip darydamos įtaką bendram MRSA virulentiškumui (Stacey L. Kolar ir kt., 2013).

MRSA gamina želatinazę, kuri hidrolizuoja želatiną, kolageną, kazeiną ir kitus baltymus. Šis fermentas dalyvauja bioplėvelės formavime ir yra susijęs su endokardito išsivystymu (Jung-Whan Chon ir kt., 2020). Mūsų tyrime, daugumoje tirtų MRSA klinikinių izoliatų buvo nustatytas želatinazės aktyvumas. Panašius rezultatus pateikė ir daugelis kitų autorių (Seraphine Nkie Esemu ir kt., 2024; Amit Karmakar ir kt., 2016). Mūsų tyrime genų paplitimas tiek želatinazės teigiamose, tiek neigiamose izoliatuose buvo labai panašus, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Apskritai, rezultatai neatskleidė aiškos koreliacijos tarp genų paplitimo ir želatinazės aktyvumo. Žinoma, kad želatinazė gali padėti bakterijoms pradėti formuoti bioplėvelę pradinėse stadijose – jis ardo audinius ir leidžia bakterijoms lengviau prisitvirtinti bei daugintis ant paviršių. Šiame tyrime beveik visi MRSA izoliatai formavo bioplėveles ir gamino želatinazę, o vidutiniškai bioplėveles formuojantys izoliatai dažniau pasižymėjo želatinazės aktyvumu, nei silpnai formuojantys, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas.

Sideroforų aktyvumas MRSA klinikiniuose izoliatuose dažnai būna reikšmingas, nes šie fermentai leidžia bakterijai efektyviai įsisavinti geležį, kuri yra būtina jos augimui ir virulentiškumui, ypač geležies stokojančioje aplinkoje, kaip žmogaus organizmas (Warinda Prommachote ir kt., 2025; Ghassan Ghsein ir kt., 2022). Mūsų tyrime sideroforų aktyvumas siekė 86,7 proc. tirtų izoliatų. Nors sideroforai yra svarbūs MRSA išgyvenimui ir gali turėti įtakos bakterijų virulentiškumui, tiesioginės sąsajos su specifiniais toksinų genais ar bioplėvelių formavimu nėra plačiai ištirtos. Šiame tyrime matoma tendencija, kad bakterijos, turinčios patogenezės mechanizmus koduojančius ir su bioplėvelių formavimu susijusius genus, dažniau gamino sideroforus, o *fnbA* geno atveju ši teigiama

koreliacija buvo statistiškai reikšminga ($p = 0,016$). Tačiau *cna* ir *icaC* genai išsiskyrė iš bendros tendencijos – izoliatai su šiais genais rečiau gamino sideroforus ir šis rezultatas statistiškai reikšmingas. Daugiau tyrimų šioje srityje padėtų geriau suprasti lipazės, želatinazės, proteinazių ir sideroforų vaidmenį MRSA patogenezėje bei bioplėvelių formavime.

IŠVADOS

1. Dažniausiai aptikti genai buvo susiję su bioplėvelių formavimu - *spa* (100 proc.), *icaR* (96,7 proc.), *fnbA* (94,4 proc.) *clfB* (86,5 proc.), *icaD* (83,3 proc.) ir *icaB* (78,9 proc.). PVL toksiną koduojantis genas (*lukS/F-PV*) buvo labiausiai paplitęs (78,9 proc.) tarp tirtų patogenezės mechanizmus koduojančių genų. Genų poros *lukS/F-PV* ir *fnbA*, *lukS/F-PV* ir *clfB*, *fnbA* ir *clfB*, bei *fnbB* ir *sec* dažnai buvo aptinkamos kartu ($p < 0,05$).

2. Genas *seb* statistiškai reikšmingai dažniau aptiktas silpnai (10,5 proc) bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose, nei vidutiniškai (0,0) ($p < 0,05$), o genas *ebps* reikšmingai dažniau aptiktas vidutiniškai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose (17,4 proc.) nei silpnai (7,9 proc.) ($p = 0,05$). Vidutiniškai bioplėvelės formuojantys MRSA dažniau turėjo didesnę genų įvairovę.

3. Visi tirti MRSA izoliatai pasižymėjo lipazių aktyvumu. Dauguma taip pat turėjo želatinazių (94,4 proc.) ir sideroforų aktyvumą (86,7 proc.). Proteazių aktyvumas buvo rečiausiai aptiktas (42,2 proc.). Nė vienas iš šių virulentiškumo veiksnių neturėjo statistiškai reikšmingos sąsajos su MRSA gebėjimu formuoti bioplėveles.

4. Proteazių aktyvumas statistiškai reikšmingai teigiamai koreliavo su kai kuriais bioplėvelių formavimą lemiančiais genais (*icaC*, *clfA*, *ebps*), o sideroforų aktyvumas reikšmingai koreliavo su *fnbA*, *cna* ir *icaC* genais.

REKOMENDACIJOS

1. Rekomenduojama tęsti PVL toksiną koduojančio geno paplitimo stebėseną klinikiniuose MRSA izoliatuose, atsižvelgiant į pastebėtą jo didėjimo tendenciją tiek mūsų, tiek kitų autorių tyrimuose.

2. Rekomenduojama išsamiau nagrinėti bioplėvelės formavimo ir toksinus koduojančių genų tarpusavio ryšius, ypatingą dėmesį skiriant ne tik dažnai pasitaikantiems genams, tokiems kaip *lukS/F-PV*, bet ir rečiau aptinkamiems enterotoksinams, kadangi pastebėta galima neigiama koreliacija tarp bioplėvelės formavimo ir toksinų genų.

3. Atsižvelgiant į tai, kad *spa* genas buvo aptiktas visuose izoliatuose ir galimai daro įtaką bioplėvelių formavimui, rekomenduojama atlikti *spa* geno tipavimą ir įvertinti jo ryšį su bioplėvelių formavimo stiprumu.

4. Rekomenduojama atlikti panašų tyrimą į analizę įtraukiant klinikinius MRSA izolatus, kurie visiškai neformuoja arba stipriai formuoja bioplėveles. Tai leistų tiksliau įvertinti galimas sąsajas tarp bioplėvelės formavimo intensyvumo ir virulentiškumo veiksnių.

AUTORIAUS ASMENINIS INDĖLIS

Darbo idėja ir tikslas buvo suformuluoti darbo vadovės dr. Tatjanos Kirtiklienės bendrai su darbo autore. Prieš galutinį tyrimo sumanymą buvo atlikta literatūros analizė, kuri padėjo apsispręsti dėl tyrimo krypties, pasirinktų virulentiškumo genų ir metodų. Tyrimo metu vyko nuolatinės konsultacijos su darbo vadove, siekiant užtikrinti sklandų darbą ir mokslinį tyrimų pagrįstumą.

Autorės asmeninis indėlis į tyrimą apima šias sritis:

- Tyrimo atlikimas: visus eksperimentus darbo autorė atliko savarankiškai, po išsamių darbo vadovės dr. Tatjanos Kirtiklienės apmokymų. Vilniaus universiteto Medicinos fakultete vykdyti tyrimai buvo atliekami prižiūrint ir konsultuojantis su bendradarbiaujančia mokslininke doc. dr. Agne Kirkliauskiene.
- Duomenų tvarkymas ir analizė: eksperimentų metu surinktus duomenis darbo autorė sistemino ir analizavo savarankiškai, konsultuodamasi su darbo vadove ir kitais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro mokslininkais.
- Metodologija: literatūros analizė buvo atlikta darbo autorės bendrai su darbo vadove. Tyrimo metodų parinkimas buvo atliktas darbo vadovės.
- Rašymas: tyrimo aprašymą, analizės pristatymą, darbo tekstą bei tyrimų vizualizavimą darbo autorė parengė pati. Darbo turinys, formuluotės ir struktūra koreguoti kartu su darbo vadove.

REZULTATŲ SKLAIDA

Darbo rezultatai pristatyti tarptautinėse konferencijose:

1. **Dorota Demjanko**, Agnė Kirkliauskienė, Greta Vizujė, Jolanta Miciulevičienė, Tatjana Kirtiklienė. Identification of pathogenesis mechanisms and biofilm formation factors in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates. Konferencija „The COINS 2025“, kovo 17 - 20 d., Vilnius, Lietuva (stendinis pranešimas ir Pitch sesija).
2. **Dorota Demjanko**, Agnė Kirkliauskienė, Greta Vizujė, Jolanta Miciulevičienė, Tatjana Kirtiklienė. Identification of biofilm formation factors in clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates. Konferencija „OPEN READINGS 2025“, gegužės 13-16 d., Vilnius, Lietuva (stendinis pranešimas).

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Dorota Demjanko

Magistro baigiamasis darbas

**Patogenezės mechanizmų ir bioplėvelės formavimo faktorių nustatymas meticilinui
atspariuose *Staphylococcus aureus* (MRSA) kamienuose**

SANTRAUKA

Staphylococcus aureus infekcijos yra viena dažniausių hospitalinių mirčių priežasčių Lietuvoje ir pasaulyje. Dėl sudėtingų virulentiškumo mechanizmų ši bakterija geba išvengti imuninės sistemos, kolonizuoti audinius ir gyvybei pavojingas būkles. Ypač pavojingi meticilinui atsparūs (MRSA) ir bioplėvelės formuojantys kamienai, kurie apsunkina gydymą.

Šiame tyrime tirti ir analizuoti MRSA genetiniai ir fenotipiniai virulentiškumo veiksniai bei jų tarpusavio ryšiai. Buvo tirti 22 virulentiškumo genai (taikant PGR), bioplėvelės formavimo gebėjimas (kolorimetriniu metodu), taip pat ekstraląstelių fermentų bei sideroforų aktyvumas (lėkštelių metodu). Analizuota 90 klinikinių MRSA izoliatų iš dviejų Vilniaus miesto ligoninių. Tyrimas svarbus siekiant geriau suprasti MRSA patogenezės mechanizmus.

Dažniausiai aptikti genai buvo susiję su bioplėvelių formavimu (*spa*, *icaR*, *fnbA*, *clfB*, ir *icaD*). Jų paplitimas siekė 83,3 – 100 proc. Nustatyta, jog kai kurie genai turėjo įtaką bioplėvelių formavimo stiprumui: genas *seb* statistiškai reikšmingai dažniau aptiktas silpnai (10,5 proc.) bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose, nei vidutiniškai (0,0) ($p < 0,05$), o genas *ebps* reikšmingai dažniau aptiktas vidutiniškai bioplėvelės formuojančiuose izoliatuose (17,4 proc.) nei silpnai (7,9 proc.) ($p = 0,05$). Nors ekstraląstelių fermentų ir sideroforų aktyvumas buvo plačiai paplitęs tirtuose MRSA izoliatuose, nė vienas iš šių virulentiškumo veiksnių neturėjo statistiškai reikšmingos sąsajos su MRSA gebėjimu formuoti bioplėvelės. Tačiau proteazių aktyvumas statistiškai reikšmingai teigiamai koreliavo su kai kuriais bioplėvelių formavimą lemiančiais genais (*icaC*, *clfA*, *ebps*), o sideroforų aktyvumas reikšmingai koreliavo su *fnbA*, *cna* ir *icaC* genais.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Dorota Demjanko

Master's Thesis

Identification of Pathogenesis Mechanisms and Biofilm Formation Factors in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains

ABSTRACT

Staphylococcus aureus infections are among the leading causes of hospital-associated mortality in Lithuania and worldwide. Due to complex virulence mechanisms, this bacterium can evade the immune system, colonize tissues, and cause life-threatening conditions. Particularly concerning are methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains and those capable of biofilm formation, which complicate treatment.

This study investigated the genetic and phenotypic virulence factors of MRSA and their correlation. 22 virulence-associated genes were analyzed by PCR, biofilm formation was assessed using a colorimetric method, and extracellular enzyme and siderophore activities were evaluated by plate assays. A total of 90 clinical MRSA isolates from two Vilnius hospitals were examined. The findings contribute to a better understanding of MRSA pathogenesis mechanisms.

Genes related to biofilm formation (*spa*, *icaR*, *fnbA*, *clfB*, and *icaD*) were the most prevalent, detected in 83.3–100% of isolates. Certain genes were significantly associated with biofilm formation strength: the *seb* gene was more frequently found in weak biofilm producers (10.5%) compared to moderate producers (0.0%) ($p < 0.05$), while the *ebps* gene was more common in moderate biofilm producers (17.4%) than in weak producers (7.9%) ($p = 0.05$). Although extracellular enzyme and siderophore activities were widespread among MRSA isolates, no statistically significant association with biofilm formation ability was observed. However, protease activity positively correlated with specific biofilm-related genes (*icaC*, *clfA*, *ebps*), and siderophore activity correlated significantly with *fnbA*, *cna* and *icaC* genes.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdulah, N. S., & Al-Hejjaj, M. Y. (2022). The relative of spa gene types, prevalence and antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Archives of Razi Institute, 77(6), 2423–2430. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.358867.2320>.
2. Abdurrahman G, Schmiedeke F, Bachert C, Bröker BM, Holtfreter S. Allergy-A New Role for T Cell Superantigens of *Staphylococcus aureus*? Toxins (Basel). 2020 Mar 12;12(3):176. doi: 10.3390/toxins12030176.
3. Abebe AA, Birhanu AG. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat. Infect Drug Resist. 2023 Dec 14;16:7641-7662. doi: 10.2147/IDR.S428103.
4. Aghmiyuni, Z. F., Ahmadi, M. H., & Sadari, H. (2024). Relationship between the strength of biofilm production and the presence of *pvl* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from skin and soft tissue infections. Heliyon, 10(23), e40524. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40524>
5. Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, Molle V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. Toxins (Basel). 2021 Sep 23;13(10):677. doi: 10.3390/toxins13100677.
6. Ayliffe GA. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 1997 Jan;24 Suppl 1:S74-9. doi: 10.1093/clinids/24.supplement_1.s74.
7. Ali Alghamdi B, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Musamed Alshamrani H, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, Yusnoraini Yusof N. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Saudi J Biol Sci. 2023 Apr;30(4):103604. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103604.
8. Alonzo, F., 3rd, & Torres, V. J. (2014). The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 78(2), 199–230. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-13>
9. Alorabi, M., Ejaz, U., Khoso, B. K., Uddin, F., Mahmoud, S. F., Sohail, M., & Youssef, M. (2023). Detection of genes encoding microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pyoderma patients. Genes, 14(4). <https://doi.org/10.3390/genes14040783>.
10. Amelia, S., Kusumawati, R. L., Balatif, R., Tania, T., Winda, L., & Syamira, N. A. (2023). Diversity of Spa gene between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteria in a tertiary referral hospital, Indonesia. Medical Journal of Indonesia, 32(2), 75–79. <https://doi.org/10.13181/mji.oa.236862>

11. Aniba R, Dihmane A, Raqraq H, Ressmi A, Nayme K, Timinouni M, Barguigua A. Exploring staphylococcus in urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis on the epidemiology, antibiotic resistance and biofilm formation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2024 Dec;110(4):116470. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116470.
12. Atiyah, S. A., Degaimand, Z. D., Al-Yassari, A. S., & Abady, N. (2019). The frequency of ebps and v8 genes in *Staphylococcus aureus* isolates from different sources in thiqr province-iraq.
13. Azzam, A., Shawky, R. M., & El-Mahdy, T. S. (2024). Sub-inhibitory concentrations of ceftriaxone induce morphological alterations and PIA-independent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(1), 297–308. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01177-x>.
14. Bamneshin, K., Poudineh, M., Alibabaei, R. H., Amiri, M. R. J., Fateminasab, Z. S., Ghorbani, Z., Maleki, R., & Khaledi, A. (2024). Prevalence of icaADBC genes, and correlation with biofilms and antibiotic resistance in *S. aureus*: a systematic review and meta-analysis. *Germes*, 14(4), 387–401. <https://doi.org/10.18683/germes.2024.1448>.
15. Bashabsheh, R. H. F., Al-Fawares, O., Natsheh, I., Bdeir, R., Al-Khreshieh, R. O., & Bashabsheh, H. H. F. (2024). *Staphylococcus aureus* epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and application of nano-therapeutics as a promising approach to combat methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Global Health*, 118(3), 209–231. <https://doi.org/10.1080/20477724.2023.2285187>.
16. Bennett MR, Thomsen IP. Epidemiological and Clinical Evidence for the Role of Toxins in *S. aureus* Human Disease. *Toxins (Basel)*. 2020 Jun 19;12(6):408. doi: 10.3390/toxins12060408.
17. Bertelloni, F., Fratini, F., Ebani, V. V., Galiero, A., Turchi, B., & Cerri, D. (2015). Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. *Dairy Science & Technology*, 95(3), 341–352. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0214-9>.
18. Bhati T, Nathawat P, Sharma SK, Yadav R, Bishnoi J, Kataria AK. Polymorphism in spa gene of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. *Vet World*. 2016 Apr;9(4):421-4. doi: 10.14202/vetworld.2016.421-424. Epub 2016 Apr 28.
19. Bhatta, D. R., Cavaco, L. M., Nath, G., Kumar, K., Gaur, A., Gokhale, S., & Bhatta, D. R. (2016). Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1531-1>

20. Cakır Aktas N, Erturan Z, Karatuna O, Karahasan Yagci A. Panton-Valentine leukocidin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. J Infect Dev Ctries. 2013 Nov 15;7(11):888-91. doi: 10.3855/jidc.4135. PMID: 24240049.
21. Caldera, J. R., Tsai, C.-M., Trieu, D., Gonzalez, C., Hajam, I. A., Du, X., Lin, B., & Liu, G. Y. (2024). The characteristics of pre-existing humoral imprint determine efficacy of *S. aureus* vaccines and support alternative vaccine approaches. Cell Reports. Medicine, 5(1), 101360. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101360>.
22. Chan YL, Chee CF, Tang SN, Tay ST. Unveiling genetic profiles and correlations of biofilm-associated genes, quorum sensing, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from a Malaysian Teaching Hospital. Eur J Med Res. 2024 Apr 22;29(1):246. doi: 10.1186/s40001-024-01831-6. PMID: 38649897; PMCID: PMC11036768.
23. Chaudhari, A., Pandey, S., Dwivedi, M.K. (2022). Determination of Gelatinases, Glycosidases, and Enolase Production. In: Dwivedi, M.K., Amaesan, N., Sankaranarayanan, A., Begum, R. (eds) Biosafety Assessment of Probiotic Potential. Methods and Protocols in Food Science . Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2509-5_2
24. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence. 2021 Dec;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.
25. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., 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. Journal of Clinical Microbiology, 22(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
26. Cieza MYR, Bonsaglia ECR, Rall VLM, Santos MVD, Silva NCC. Staphylococcal Enterotoxins: Description and Importance in Food. Pathogens. 2024 Aug 9;13(8):676. doi: 10.3390/pathogens13080676.
27. de Jong NWM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. Microbiol Spectr. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.gpp3-0061-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019.
28. Esemu, S. N., Nya’Nying, S. F., Ndip, L. M., Bessong, P. O., Tanih, N. F., Smith, S. I., & Ndip, R. N. (2024). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in North West Cameroon: public health implications. BMC Research Notes, 17(1), 389. <https://doi.org/10.1186/s13104-024-07073-3>.
29. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2023. Stockholm: ECDC; 2024. Stockholm,

30. GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*. 2024 Sep 28;404(10459):1199-1226. doi: 10.1016/S0140-6736(24)01867-1.
31. Ghazvinian, M., Asgharzadeh Marghmalek, S., Gholami, M., Amir Gholami, S., Amiri, E., & Goli, H. R. (2024). Antimicrobial resistance patterns, virulence genes, and biofilm formation in enterococci strains collected from different sources. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 274. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09117-2>.
32. Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). The key element role of metallophores in the pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*: A review. *Biology*, 11(10), 1525. <https://doi.org/10.3390/biology11101525>.
33. Gimza BD, Jackson JK, Frey AM, Budny BG, Chaput D, Rizzo DN, Shaw LN. Unraveling the Impact of Secreted Proteases on Hypervirulence in *Staphylococcus aureus*. *mBio*. 2021 Feb 23;12(1):e03288-20. doi: 10.1128/mBio.03288-20.
34. Girma A. *Staphylococcus aureus*: Current perspectives on molecular pathogenesis and virulence. *Cell Surf*. 2024 Dec 9;13:100137. doi: 10.1016/j.tcs.2024.100137.
35. Goudarzi H, Goudarzi M, Sabzehali F, Fazeli M, Salimi Chirani A. Genetic analysis of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates: High prevalence of multidrug-resistant ST239 with strong biofilm-production ability. *J Clin Lab Anal*. 2020 Nov;34(11):e23494. doi: 10.1002/jcla.23494.
36. Goudarzi M, Mohammadi A, Amirpour A, Fazeli M, Nasiri MJ, Hashemi A, Goudarzi H. Genetic diversity and biofilm formation analysis of *Staphylococcus aureus* causing urinary tract infections in Tehran, Iran. *J Infect Dev Ctries*. 2019 Sep 30;13(9):777-785. doi: 10.3855/jidc.11329. PMID: 32074086.
37. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*. 2016 Sep;273(1):357-70. doi: 10.1111/imr.12453.
38. Gries CM, Biddle T, Bose JL, Kielian T, Lo DD. *Staphylococcus aureus* Fibronectin Binding Protein A Mediates Biofilm Development and Infection. *Infect Immun*. 2020 Apr 20;88(5):e00859-19. doi: 10.1128/IAI.00859-19.
39. Gundogan, N., Ataol, O., & Torlak, F. O. (2013). Determination of Some Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Meat and Milk Products. *Journal of Food Safety*, 33(4), 387-393.
40. Hashem, Y. A., Abdelrahman, K. A., & Aziz, R. K. (2021). Phenotype–Genotype Correlations and Distribution of Key Virulence Factors in *Enterococcus faecalis* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1713–1723. <https://doi.org/10.2147/IDR.S305167>.

41. Hernández-Cuellar E, Tsuchiya K, Valle-Ríos R, Medina-Contreras O. Differences in Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. *Diseases*. 2023 Nov 5;11(4):160. doi: 10.3390/diseases11040160.
42. Hou Z, Liu L, Wei J, Xu B. Progress in the Prevalence, Classification and Drug Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist*. 2023 May 25;16:3271-3292. doi: 10.2147/IDR.S412308.
43. Hussain K, Bandyopadhyay A, Roberts N, Mughal N, Moore LSP, Fuller LC. Panton-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*: a clinical review. *Clin Exp Dermatol*. 2022 Dec;47(12):2150-2158. doi: 10.1111/ced.15392.
44. Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>.
45. Javed MU, Ijaz M, Durrani AZ, Ali MM. On-farm epidemiology, virulence profiling, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at goat farms. *Microb Pathog*. 2023 Dec;185:106456. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106456.
46. Jomehzadeh, N., & Emrani, S. S. (2025). Assessment of biofilm formation, antibiotic resistance patterns, and the prevalence of adhesion-related genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Heliyon*, 11(1), e41537. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41537>.
47. Kaneko, H., Kanai, M., Saito, T., Yanagi, Y., Kobayashi, H., Kurihara, R., Ikeda, M., Nemoto, O., Baba, N., Matsuzaki, Y., Sawamura, D., Shimoe, F., Inaba, Y., Kobayashi, Y., Kawasaki, S., Ueki, T., Funatsu, S., Shirahama, S., Oba, M., ... Nakaminami, H. (2023). Significant increase in the prevalence of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, particularly the USA300 variant Ψ USA300, in the Japanese community. *Microbiology Spectrum*, 11(6), e0124823. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01248-23>
48. Kaushik, A., Kest, H., Sood, M., Steussy, B. W., Thieman, C., & Gupta, S. (2024). Biofilm producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in humans: Clinical implications and management. *Pathogens*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens13010076>
49. Kinney, K. J., Tang, S. S., Wu, X.-J., Tran, P. M., Bharadwaj, N. S., Gibson-Corley, K. N., Forsythe, A. N., Kulhankova, K., Gumperz, J. E., & Salgado-Pabón, W. (2022). SEC is an antiangiogenic virulence factor that promotes *Staphylococcus aureus* endocarditis independent of superantigen activity. *Science Advances*, 8(19), eabo1072. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo1072>.

50. Kirkliauskienė, A., Kriščiūnas, J., Miciulevičienė, J., Radzišauskienė, D., Kačergius, T., Bratchikov, M., & Kaplerienė, L. (2024). Antimicrobial resistance and the prevalence of the Panton-valentine leukocidin gene among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Lithuania. *Polish Journal of Microbiology*, 73(1), 21–28. <https://doi.org/10.33073/pjm-2024-003>.
51. Kolar, S. L., Ibarra, J. A., Rivera, F. E., Mootz, J. M., Davenport, J. E., Stevens, S. M., Horswill, A. R., & Shaw, L. N. (2013). Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *MicrobiologyOpen*, 2(1), 18–34. <https://doi.org/10.1002/mbo3.55>
52. Kot, B., Piechota, M., Jakubczak, A., Gryzińska, M., Witeska, M., Gruzewska, A., Baran, K., & Denkiewicz, P. (2022). The prevalence of virulence determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different infections in hospitalized patients in Poland. *Scientific Reports*, 12(1), 5477. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09517-x>
53. Lade H, Kim JS. Molecular Determinants of β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics* (Basel). 2023 Aug 24;12(9):1362. doi: 10.3390/antibiotics12091362.
54. Lai, C.-H., Wong, M. Y., Huang, T.-Y., Kao, C.-C., Lin, Y.-H., Lu, C.-H., & Huang, Y.-K. (2024). Exploration of agr types, virulence-associated genes, and biofilm formation ability in *Staphylococcus aureus* isolates from hemodialysis patients with vascular access infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1367016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1367016>.
55. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999 Nov;29(5):1128-32. doi: 10.1086/313461.
56. Lindsay, J. A. (2019). Staphylococci: Evolving genomes. In *Gram-Positive Pathogens*, Third Edition (pp. 485–498). American Society of Microbiology.
57. Locke, T. E., Keeley, A. J., Laundry, N., Keil, C., Hamilton, J., Pandor, A., I de Silva, T., & Darton, T. C. (2025). Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonisation among healthy individuals in low- and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infection*, 90(4), 106462. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2025.106462>
58. Loudon, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education: JMBE*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>.

59. Lozano C, Fernández-Fernández R, Ruiz-Ripa L, Gómez P, Zarazaga M, Torres C. Human mecC-Carrying MRSA: Clinical Implications and Risk Factors. *Microorganisms*. 2020 Oct 20;8(10):1615. doi: 10.3390/microorganisms8101615.
60. Mahmood, A. R., Hussein, N. M., & Hussein, N. M. (2022). Detection of biofilm-forming genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR assay. *Journal of Natural Science*, 1.
61. Maželienė, Ž., Plančiūnienė, R., Lastauskaitė, S., Aleksandravičienė, A., & Viliušienė, I. (2022). Klinikinių *Staphylococcus aureus* padermių atsparumas antibiotikams ir bioplėvelių sudarymo aktyvumas. *Sveikatos Mokslai*, 32(7), 102–107. <https://doi.org/10.35988/sm-hs.2022.255>.
62. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2009 Feb;191(3):832-43. doi: 10.1128/JB.01222-08. Epub 2008 Dec 1.
63. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 22;23(15):8088. doi: 10.3390/ijms23158088.
64. Mohammadi, A., Goudarzi, M., Dadashi, M., Soltani, M., Goudarzi, H., & Hajikhani, B. (2020). Molecular detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolates: Evidence from Shahid Motahari Hospital in Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 13(7). <https://doi.org/10.5812/jjm.102058>.
65. MsangoSoko, K., Gandotra, S., Bhattacharya, R., Ramakrishnan, B., Sharma, K., & Subramanian, S. (2022). Screening and characterization of lipase producing bacteria isolated from the gut of a lepidopteran larvae, *Samia ricini*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25(1), 101856.
66. Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, Kurokawa I, So H, Sasatsu M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun;44(6):2119-25. doi: 10.1128/JCM.02690-05.
67. Nourbakhsh F, Namvar AE. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control*. 2016 Mar 22;11:Doc07. doi: 10.3205/dgkh000267. PMID: 27303652; PMCID: PMC4804124.
68. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel)*. 2018 Jun 19;10(6):252. doi: 10.3390/toxins10060252.
69. Oliveira R, Pinho E, Almeida G, Azevedo NF, Almeida C. Prevalence and Diversity of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Milk From Northern Portugal. *Front Microbiol*. 2022 Mar 22;13:846653. doi: 10.3389/fmicb.2022.846653.

70. Oliveira, A., & Cunha, M. de L. R. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*, 3(1), 260. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-260>.
71. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014 Jan;22(1):42-7. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.003. Epub 2013 Dec 9.
72. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Dec 22;12(1):12. doi: 10.3390/antibiotics12010012.
73. Petraitiene B, Conejo PR, Jankauskaite L, Kevalas R, Trumpulyte G, Snipaitiene A, Vitkauskienė A, Gurskis V. Prevalence, clinical expression, invasiveness and outcome of *Staphylococcus aureus* containing Pantón-Valentine leukocidin in children treated in a university hospital of Lithuania. *Infect Dis (Lond)*. 2020 Jul;52(7):464-472. doi: 10.1080/23744235.2020.1752395.
74. Pietrocola G, Nobile G, Rindi S, Speziale P. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 5;7:166. doi: 10.3389/fcimb.2017.00166.
75. Potindji, T. M. F., Momani, O. A. A., Omowumi, B. B., & Baddal, B. (2022). Screening of toxin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a hospital setting in a tertiary hospital in Northern Cyprus. *Polish Journal of Microbiology*, 71(4), 491–497. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-042>
76. Prommachote, W., Deeudom, M., Koonyosying, P., Srichomphoo, P., Somnabut, R., Khamnoi, P., Cilibrizzi, A., Ravikumar, Y., & Srichairatanakool, S. (2025). Drug susceptibility, siderophore production, and genome analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital in Chiang Mai, Thailand. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 14(5), 521. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050521>.
77. Puspitarini, M. D., Kuntaman, K., Wasito, E. B., & Setyarini, W. (2021). Molecular genotyping of *tsst-1* gene *Staphylococcus aureus* from clinical specimen. *Folia Medica Indonesiana*, 57(2), 129. <https://doi.org/10.20473/fmi.v57i2.17559>
78. Rajapitamahuni, S., Lyou, E. S., Kang, B. R., & Lee, T. K. (2023). Microbial interaction-induced siderophore dynamics lead to phenotypic differentiation of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1277176. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1277176>.
79. Rasquel-Oliveira, F. S., Ribeiro, J. M., Martellosi-Cebinelli, G., Costa, F. B., Nakazato, G., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2025). *Staphylococcus aureus* in Inflammation and Pain:

Update on Pathologic Mechanisms. Pathogens, 14(2).
<https://doi.org/10.3390/pathogens14020185>.

80. Rungelrath V, Porter AR, Malachowa N, Freedman BA, Leung JM, Voyich JM, Otto M, Kobayashi SD, DeLeo FR. Further Insight into the Mechanism of Human PMN Lysis following Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Spectr. 2021 Oct 31;9(2):e0088821. doi: 10.1128/Spectrum.00888-21. Epub 2021 Oct 27.
81. Saising, J., Singdam, S., Ongsakul, M., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions. Bioscience Trends, 6(4), 160–164. <https://doi.org/10.5582/bst.2012.v6.4.160>.
82. Schwermann N, Winstel V. Functional diversity of staphylococcal surface proteins at the host-microbe interface. Front Microbiol. 2023 May 18;14:1196957. doi: 10.3389/fmicb.2023.1196957.
83. Scully, J., Mustafa, A. S., Hanif, A., Tunio, J. H., & Tunio, S. N. J. (2024). Immune responses to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections and advances in the development of vaccines and immunotherapies. Vaccines, 12(10). <https://doi.org/10.3390/vaccines12101106>.
84. Shoaib M, Aqib AI, Muzammil I, Majeed N, Bhutta ZA, Kulyar MF, Fatima M, Zaheer CF, Muneer A, Murtaza M, Kashif M, Shafqat F, Pu W. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. Front Microbiol. 2023 Jan 10;13:1067284. doi: 10.3389/fmicb.2022.1067284.
85. Shohayeb, M., El-Banna, T., Elsayy, L. E., & El-Bouseary, M. M. (2023). Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes may not be a reliable marker for community-acquired MRSA in the Dakahlia Governorate, Egypt. BMC Microbiology, 23(1), 315. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03065-8>
86. Shukla SK, Rao TS. Targeting hydrophobicity in biofilm-associated protein (Bap) as a novel antibiofilm strategy against *Staphylococcus aureus* biofilm. Biophys Chem. 2022 Oct;289:106860. doi: 10.1016/j.bpc.2022.106860.
87. Silva-de-Jesus AC, Ferrari RG, Panzenhagen P, Dos Santos AMP, Portes AB, Conte-Junior CA. Distribution of Antimicrobial Resistance and Biofilm Production Genes in the Genomic Sequences of *S. aureus*: A Global In Silico Analysis. Antibiotics (Basel). 2025 Apr 1;14(4):364. doi: 10.3390/antibiotics14040364. PMID: 40298499; PMCID: PMC12024283.
88. Singh G, Broor S, Agarwal P. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* using *spa* typing as a diagnostic tool in Haryana, India. Indian J Med Microbiol. 2018 Jan-Mar;36(1):26-31. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_17_330. PMID: 29735822.
89. Slavkin HC. Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. J Am Dent Assoc. 1997 Apr;128(4):492-5. doi: 10.14219/jada.archive.1997.0238.

90. Stepanović, S.; Vuković, D.; Dakić, I.; Savić, B.; Švabić-Vlahović, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 2000, 40, 175–179
91. Tigabu A, Getaneh A. *Staphylococcus aureus*, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: a Literature Review. *Clin Lab.* 2021 Jul 1;67(7). doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.200930.
92. Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Idres, T., & Touati, A. (2025). *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 14(5), 470. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050470>
93. Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, Soni R, Khan S. Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* vs. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Cureus.* 2020 Jun 27;12(6):e8867. doi: 10.7759/cureus.8867.
94. Tuffs SW, Haeryfar SMM, McCormick JK. Manipulation of Innate and Adaptive Immunity by Staphylococcal Superantigens. *Pathogens.* 2018 May 29;7(2):53. doi: 10.3390/pathogens7020053.
95. Valle J, Fang X, Lasa I. Revisiting Bap Multidomain Protein: More Than Sticking Bacteria Together. *Front Microbiol.* 2020 Dec 23;11:613581. doi: 10.3389/fmicb.2020.613581.
96. Wang C, Su Y, Shahriar SMS, Li Y, Xie J. Emerging strategies for treating medical device and wound-associated biofilm infections. *Microb Biotechnol.* 2024 Oct;17(10):e70035. doi: 10.1111/1751-7915.70035. PMID: 39431971; PMCID: PMC11492805.
97. Wang X. *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates. *Methods Mol Biol.* 2020;2069:89-94. doi: 10.1007/978-1-4939-9849-4_6. PMID: 31523767.
98. Wu, X., Wang, H., Xiong, J., Yang, G.-X., Hu, J.-F., Zhu, Q., & Chen, Z. (2024). *Staphylococcus aureus* biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products derived therapeutics. *Biofilm*, 7(100175), 100175. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100175>
99. Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F. B., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2008). Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *Journal of Basic Microbiology*, 48(4), 308–314. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700289>.